

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2001 年 4 月 12 日 (12.04.2001)

PCT

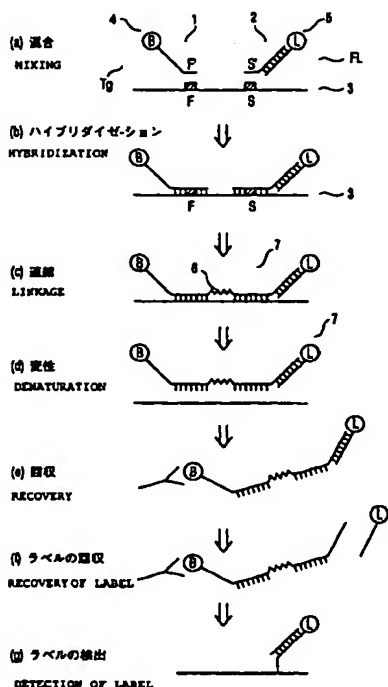
(10) 国際公開番号
WO 01/25481 A1

(51) 国際特許分類⁷: C12Q 1/68 特願平11/283437 1999 年 10 月 4 日 (04.10.1999) JP
(21) 国際出願番号: PCT/JP00/06919 (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): オリンパス光学工業株式会社 (OLYMPUS OPTICAL CO., LTD.) [JP/JP]; 〒151-0072 東京都渋谷区幡ヶ谷2丁目43番2号 Tokyo (JP).
(22) 国際出願日: 2000 年 10 月 4 日 (04.10.2000)
(25) 国際出願の言語: 日本語
(26) 国際公開の言語: 日本語 (72) 発明者; および (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 陶山 明 (SUYAMA, Akira) [JP/JP]; 〒192-0372 東京都八王子市下柚木3丁目2番6-501 Tokyo (JP). 堀 邦夫
(30) 優先権データ: 特願平11/283148 1999 年 10 月 4 日 (04.10.1999) JP

[続葉有]

(54) Title: METHOD OF DETECTING NUCLEIC ACID

(54) 発明の名称: 核酸検出方法



(57) Abstract: A method of detecting or quantitating a target nucleic acid contained in a sample. In this method, artificially selected probes containing flags consisting of plural units are used to thereby easily and highly accurately detect a target nucleic acid.

(57) 要約:

本発明は、試料中に存在する標的核酸を検出または定量する方法に関する。本発明は、複数のユニットから構成されるフラッグ含む人為的に選択したプローブ群を使用することにより、標的核酸を容易に且つ高精度に検出することが可能な標的核酸を検出または定量する方法を提供する。

WO 01/25481 A1



(HORI, Kunio) [JP/JP]; 〒182-0023 東京都調布市染地
2-36-1-501 Tokyo (JP).

(84) 指定国 (広域): ヨーロッパ特許 (DE, FR, GB).

(74) 代理人: 鈴江武彦, 外(SUZUYE, Takehiko et al.); 〒
100-0013 東京都千代田区霞が関3丁目7番2号 鈴柴内
外国特許法律事務所内 Tokyo (JP).

添付公開書類:

— 国際調査報告書

(81) 指定国 (国内): JP, US.

2文字コード及び他の略語については、定期発行される
各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語
のガイダンスノート」を参照。

明 細 書

核 酸 検 出 方 法

技 術 分 野

本発明は、試料中に存在する核酸分子を検出または定量する方法に関する。

背 景 技 術

生体試料中に存在する特定の核酸分子を検出する技術は、基礎的研究分野および臨床学的分野の両方において重要である。特に、該技術は、例えば、特定の臓器において発現および機能するタンパク質を核酸分子レベルで解析する場合や、情報伝達系（例えば、神経系および免疫系等）におけるタンパク質の発現およびその発現の制御メカニズムに関する研究を行う場合等に重要である。また、遺伝子的疾患に関連する変異遺伝子、癌に関連する遺伝子、およびウイルスに関連する遺伝子等を検出することによって遺伝子診断を行う際にも、該技術は極めて重要な技術である。

例えば、ハイブリダイゼーション法は、核酸分子を検出するための代表的な方法である。この方法において、目的核酸は、この目的の核酸に相補的な配列を有した核酸プローブに対してハイブリダイズする。その後、当該プローブを使用して該目的核酸が検出される。この方法の欠点は、少ないコピー数、例えば、1から1000個程度の標的核酸を検出す

ることが困難なことである。また、特異性が低いため、類似した配列を各々認識して夫々に検出することも困難である。

所謂、DNAチップは、多種類の核酸プローブが基体に固相化された装置である。従来のハイブリダイゼーション法に比べて、DNAチップを用いた検出方法はその操作が簡単である。しかしながら、固相された各プローブの至適条件が異なるために、偽陽性のハイブリダイゼーション反応が生じることが問題である。また、検出すべき核酸に応じて、固相されるプローブのデザインを変更し、適切なDNAチップをその都度製造することも必要である。一方、臨床検査では、極めて多種類の核酸が検出対象となる。従って、従来の方法では、多くの種類のDNAチップを用意しなくてはならない。

上述の方法を含む従来の技術は、多くの工程を含み煩雑である。その上、検出には長時間を要し、実施者には熟練した技術が必要とされる。

また、通常、遺伝子診断は確定診断として使用されるため、誤診は許されず、同時に迅速性も要求される。公知の従来の中には、このような要請を十分に満足する方法はない。

発明の開示

本発明の目的は、試料中から、高い特異性をもって目的とする核酸分子を検出する方法を提供することである。本発明によれば、複数種類の核酸分子が存在する試料の中から、高精度に且つ迅速に特定の核酸のみを検出および定量することが可能である。

また、本発明の他の目的は、少ないコピー数で標的配列を検出することができ、DNAチップの所要数を節約することが可能な方法を提供することである。また、本発明の他の目的は、少ない工程で簡単に実行できる方法を提供することである。

上記の目的は、以下に示す本発明により達成される；
試料中の所定の配列を有する標的核酸を検出または定量する方法であって、

(a) 以下のプローブAとプローブBを準備する工程と；

前記標的核酸中の第1の部分配列Fに相補的な配列F'と、このF'に連結された結合分子とを含む第1のプローブであるプローブA、および

前記標的核酸中の第2の部分配列Sに相補的な配列S'と、このS'に連結されたフラッグとを含む第2のプローブであるプローブB〔ここで、前記フラッグは二本鎖配列であり、その一方の鎖には標識物質が含まれる〕；

(b) 前記標的核酸中の前記第1の部分配列Fに前記第1のプローブAをハイブリダイズさせると共に、前記第2の部分配列Sに前記第2のプローブBをハイブリダイズさせる工程と、

(c) 前記標的核酸にハイブリダイズした前記第1のプローブAと前記第2のプローブBを連結してプローブ(A+B)を生じる工程と、

(d) 前記結合対の一方である物質を、前記結合分子に

高親和性の物質に結合させて前記プローブ（A + B）を回収する工程と、並びに

（e）前記フラッグを構成する核酸のうちの標識物質を含む一本鎖を回収し、前記標識物質を検出または定量することによって、前記試料中の標的核酸を検出または定量する工程と

を具備する方法である。

本発明の方法は、2つのプローブを用いて標的核酸を検出する。これによって本方法は、非特異的結合を防ぎ、且つ安定したハイブリダイゼーションを行うことが可能である。また、本方法は、プローブ（A + B）を検出することにより標的核酸の検出が達成される。従って、配列特異性が高く、且つ検出精度も高い。

また本発明は、フラッグを検出することによって標的核酸の検出を実施する。後に詳細に説明する通り、本発明の利点は、基本的に、標的核酸に関する情報をフラッグに置き換え、当該フラッグを検出または解析することによって、前記情報を入手することにある。施行者は、都合良くフラッグを設計することが可能である。従って、どのような核酸を検出対象とした場合であっても、検出対象毎にDNAチップを製造することなく、共通するDNAチップを一律に使用することが可能である。それにより、DNAチップの所要数を節約することが可能である。また、DNAチップに固相化するプローブの種類を少なくすることが可能である。また、当該フラッグの設計を工夫することにより、標的核酸の検出効率は飛

躍的に向上する。また、検出工程もより簡便になる。

例えば、安定な核酸配列を有するフラッグを設計すれば、安定した検出結果が得られる。或いは、該フラッグを複数のユニットから構成することも可能である。当該複数のユニットを使用することにより、標的核酸の情報をコード化することが可能である。即ち、フラッグ配列に含まれる複数のユニットの組合せに応じて、標的核酸の多種多様な情報をシンプルなコードに変換することが可能である。また更に、得られるコードをDNAを用いて構築すれば、当該DNAコード自体を増幅することが可能である。長さや安定性が一様なDNAコードを同一のプライマー対を用いて増幅すると、従来の標的核酸を増幅する方法と比較して顕著な定量性が得られる。従って、少ないコピー数の標的配列も正確に検出および定量することが可能である。また、特定のアルゴリズムを用いてDNAコードを数値に変換できるように設計すれば、DNA分子反応を利用する計算が可能になる。これにより、血球型やSNPS等の個人の遺伝子情報の解析の簡便化が達成できる。また、本発明では、標的核酸の情報を、任意に構成した該ユニットの組合せをコードとして読みとることが可能である。

更に、本発明は、簡便な操作により、試料中から複数種類の標的核酸を同時に検出する方法を提供することを目的とする。

この目的は、複数種類の標的核酸N1からNn（ここで、nは2以上の整数）の各々に対して、プローブA1からAn

(ここで、 n は 2 以上の整数) と、プローブ B_1 から B_n (ここで、 n は 2 以上の整数) とを用意し、上述の場合と同様の工程を経ることにより達成される。本発明によれば、各々の標的核酸は、高い特異性を持って簡便に検出される。複数種類の標的核酸を検出する場合に、フラッグは特に有利である。

図面の簡単な説明

本発明の方法の幾つかの好ましい例を、添付の図面を参照して説明する。図面は以下の通りである。

図 1 は、本発明の方法の第 1 の例を示すフローチャートである。

図 2 は、本発明の方法の第 2 の例を示すフローチャートである。

図 3 は、本発明の方法の第 3 の例を示すフローチャートである。

図 4 は、本発明の方法の第 4 の例を示すフローチャートである。

図 5 は、本発明の方法の第 5 の例を示すフローチャートである。

図 6 は、本発明の方法の更なる例を示すフローチャートである。

図 7 A は、本発明で使用するフラッグの設計例を示す表である。図 7 B は、図 7 A の設計例に対応する検出装置の例を示す図である。

図 8 は、本発明の第 1 の例の評価実験において、プローブが標的核酸と結合した状態を示す模式図である。

図 9 は、本発明の第 1 の例の評価実験に使用したプローブ A およびプローブ B、標的配列、検出用配列および変異配列を示す図である。

図 10 は、各々の洗浄過程における上清から得た配列を、キャピラリー電気泳動により検出した結果を示すチャートである。

図 11 は、検出用核酸の回収率に対する標的核酸の濃度の影響を示すグラフである。

図 12 は、検出用核酸の回収率に対する標的配列の一部が異なる変異配列の影響を示すグラフである。

図 13 A は、本発明の第 5 の例の評価実験に使用した 2 種類のプローブ A、プローブ B および標的配列を示す図である。図 13 B は、各プローブと、これを構成する要素との対応を示す図である。

図 14 A および B は、本発明のエンコード反応の特異性を示すグラフである。

図 15 は、本発明のエンコード反応の特性を評価する実験のスキーム図である。

図 16 は、本発明のエンコード反応後の P C R の定量的増幅を示すグラフである。

図 17 は、本発明のエンコード反応後の P C R の定量的増幅の試験方法を示すスキーム図である。

図 18 A および B は、本発明のデコード反応の特異性と定

量性を示すグラフである。

図 19 は、本発明のデコード反応の特異性と定量性の試験方法のスキーム図である。

発明を実施するための最良の形態

ここで使用される「核酸」の語は、cDNA、ゲノムDNA、合成DNA、mRNA、全RNA、hnRNAおよび合成RNAを含む全てのDNA並びにRNAを意味する。

ここで使用される「標的核酸」の語は、任意の配列を有する任意の核酸を示す。これに限定するものではないが、遺伝病の原因遺伝子、癌関連遺伝子、またはウイルス由来の核酸等の疾患のマーカーとなる得る核酸が特に好ましい。

ここで使用される「結合対」の語は、互いに特異的に結合し得る1対の物質をいう。例えば、アビジンとビオチン、ストレプトアビジンとビオチン、およびジゴキシニゲンとジゴキシニゲン抗体等をいうが、これに限られるものではなく、互いに特異的に結合するものであれば何れの物質を使用してもよい。従って、例えば、アビジンとビオチンの場合であれば、「結合対の一方」と言えば、アビジンまたはビオチンの何れかを指し、「結合対のもう一方の物質」と言えば、残りの一方を指す。また、ここで使用される「結合分子」の語は、「結合対の一方」または「結合対のもう一方の物質」の語と交換可能である。同様に「結合分子に高親和性な分子」または「結合分子に特異的に結合する分子」の語は「結合対の一方」または「結合対のもう一方の物質」の語と交換可能に

使用される。

ここで使用される「試料」の語は、血液、尿および唾液等の体液を示すが、これに限られるものではなく、体液以外の任意の試料も含まれる。例えば、試料が固体である場合、酵素処理、界面活性剤または有機溶媒の添加等の適切な方法で液体にすればよい。

ここで使用される「相補的な配列」とは、適切な条件下において、所定の標的核酸のみに特異的にハイブリダイズし得る配列を意味する。

例 1 . 検出方法

本発明の検出方法の 1 例を図 1 を用いて説明する（図 1）。本例の方法では、以下に示すような 2 種類の核酸プローブ（以下、単にプローブとも称す）、即ち、プローブ A 1 およびプローブ B 2 が使用される（図 1 a）。

プローブ A 1 は、該標的核酸 3 の一部の領域における塩基配列 F に対して相補的な配列 F' と、配列 F' に結合された結合分子 4 からなる。ここで、結合分子 4 は、直接に配列 F' に結合しても、または、任意の塩基配列等の何らかの仲介部分を介して間接的に配列 F' に結合してもよい。プローブ A 1 の塩基配列 F 以外の部分をタグ、タグ配列 T_g または T_g ともとも称す。例えば、任意の配列をもって間接的に結合させる場合、当該配列は如何なる塩基配列であっても、如何なる塩基数であってもよい。好ましくは、標的核酸上の塩基配列に非相補的である。或いは、他の化学的または物理的な

手段により結合されていてもよい。また、 T_g は、標的核酸の何れの部分とも結合せず、また T_g は標的核酸とどのような相互作用も生じないことが必要である。ここで使用する「非相補的」の語は、標的核酸の配列、特に、検出に使用する任意の領域の配列とハイブリダイズしない塩基配列をいう。

本発明に使用される配列 F' は、1以上の塩基数を有す。安定なハイブリダイゼーションを達成するためには、好ましくは15以上の塩基数を有す。

本発明に使用される結合分子4は、上述した通り、互いに特異的に結合する1対の分子の何れか1方であってよい。

プローブB2は、標的核酸3の一部の領域の塩基配列Sに相補的な配列 S' と、配列 S' に結合した任意のフラッグ（以下、FLとも示す）とからなる。この例では、フラッグは、配列 S' に連なる二本鎖配列とこれに続く標識物質5からなる。一般的に、フラッグは、これ自身が標的核酸3と結合はせず、また、これらは互いに如何なる相互作用も示さないことが必要である。従って、フラッグが塩基配列である場合、必ずしも全長に亘り二本鎖である必要はなく、標的核酸3に結合せず、且つ標的核酸と如何なる相互作用も示さない配列であれば部分的あるいは全体が一本鎖であってよい。また、いかなる塩基数であってよい。或いは以下の例3で詳述するように配列 S' に何れかの手段により標識物質5が結合される構造であってよい。また、フラッグが二本鎖配列である場合、これは如何なる塩基配列であってよい、如何なる塩基数であってよいが、配列Fおよび配列Sの T_m より十

分に高い T_m をもつ配列であることが必要である。特に、ここでは、フラッグが二本鎖である場合には、配列 S' に直接に結合しておらず、即ち、配列 S' に直接結合している配列にハイブリダイズしている配列をフラッグ配列という。

本発明で使用される標識物質 5 は、一般的に標識物質として使用される如何なる物質であってもよい。好ましい標識物質は、例えば、蛍光物質、発光物質、 ^{32}P 等の放射性物質、高吸収性物質、高光反射性物質、高電位性物質、磁性物質および色素等を含み、好ましくは、FITC 等の蛍光物質である。

本発明に使用される配列 S' は、1 以上の塩基数を有し、好ましくは 15 以上の塩基数を有する。

また、プローブ A 1 に具備される T_g と、プローブ B 2 に具備される F_L とは、図 1 b に示すように、両プローブが標的核酸 3 の各々目的とする領域に結合したときに、互いに遠方の端に位置するように設計されることが好ましい。また、プローブ A 1 およびプローブ B 2 は、両プローブが標的核酸 3 の各々目的とする領域に結合したときに、標的核酸 3 の隣り合う塩基に対して相補的な塩基を近方の端に有することが好ましい。これにより、以後の工程におけるライゲーションに有利となる。しかし、これに限定されるものではない。

また、プローブ A 1 および B 2 は、配列 F および配列 S の T_m が同一になるように、例えば、GC 含量や塩基の組成等の条件を適切に選択してもよい。

この例は、以下のように実施する。まず、標的核酸 3 に応

じて、上述のようなプローブ A 1 とプローブ B 2 を準備する。これらを適切な割合で、標的核酸 3 と混合する（図 1 a）。

次に、該混合物をハイブリダイゼーションに適した任意の条件で一定時間インキュベーションし、ハイブリダイゼーションを行なう（図 1 b）。

該ハイブリダイゼーションは、一般的な何れの手法によっても行なうことが可能である。好ましいハイブリダイゼーションは、先ず、核酸の変性に有効な適宜の高温、例えば、95℃で5分間静置することにより、標的核酸の相補的結合を解除して二本鎖から一本鎖へと変性させる。標的核酸が一本鎖の場合は70℃で5分間静置することにより、その2次構造へ変性させる。次に、相補的塩基配列の再結合に有効な適宜の温度、例えば55℃にて15分間静置することにより、一本鎖の標的核酸が、相補的な塩基配列と再び結合するように実施される。かかるハイブリダイゼーションにより、プローブ A 1 およびプローブ B 2 の両方が、同一の標的核酸 3 上に結合してハイブリッドを生成する。従って、使用する緩衝液の種類、温度条件等は、上述の条件に限定される必要はなく、プローブ A 1 およびプローブ B 2 が標的核酸 3 にハイブリダイズする条件であれば、どのような条件であってもよい。

次に、プローブ A 1 とプローブ B 2 を連結する（図 1 c）。本発明では、標的核酸 3 上にハイブリダイズした状態のプローブ A 1 とプローブ B 2 を連結し、プローブ（A + B）7

を生成する。この連結は連結部6の形成により達成される。

この連結には、例えば、サームス・アクアチウス (Taq) DNA・リガーゼ (Thermus aquaticus (Taq) DNA Ligase; New England Biolab 社製) 等の Taq DNA リガーゼを利用できる。しかし、これに限られず、一般的に使用される何れの連結剤も使用可能である。また、酵素的な手段に代わって、何らかの化学的な手段により、両プローブを連結してもよい。

また、標的核酸3上の配列Fと配列Sが、互いに隣接していない場合には、DNAポリメラーゼIとリガーゼを用いて、ギャップの充填反応を行えばよい。それにより、両プローブ間隙に核酸塩基が導入される。使用されるDNAポリメラーゼIとリガーゼは、一般的に使用される何れのものでもよいが、耐熱性のDNAポリメラーゼおよびリガーゼが好ましい。

続いて、前記で得たプローブ (A + B) 7 を標的核酸3から解離する (図1d)。該解離は、熱的変性等の変性処理により行なえばよい。例えば、熱的変性により行なう場合には、生理的条件下では、85℃以上、好ましくは90℃以上の温度にすればよいが、これに限定されない。ただし、フラッグ配列が二本鎖の場合はそのT_mよりも低い温度で行うことが望ましい。

次に、結合分子4、即ち、結合対の一方を、これ対して高親和性な分子に結合させることによりプローブ (A + B) 7 を回収する (図1e)。続いて、フラッグを一本鎖に変性し

、標識物質 5 の結合した一本鎖について、これに相補的な配列にハイブリダイズすることにより回収する（図 1 g）。その後、標識物質 2 を検出または定量し、標的核酸の検出または定量を達成する（図 1 g）。該検出は、使用した標識物質に応じて、一般的に使用される何れの方法も使用できる。

ここで、プローブ（A + B）7 と標識物質 5 の結合した一本鎖を、Bound / Free 分離（以降、B / F 分離と称する）により回収することにより、精度が向上されている。この B / F 分離は、一般的に使用される B / F 分離に準じて行なうことが可能である。

本方法において、標識物質 5 の結合した一本鎖のための好ましい B / F 分離は、当該一本鎖に相補的な塩基配列を適当な支持体上に固相化させた固相担体を用いて行える（図 1 g）。プローブ（A + B）7 のための好ましい B / F 分離は、当該結合分子 4 に特異的に結合する分子を適当な支持体上に固相化させた固相担体を用いて行える（図 1 e）。

使用される支持体には、例えば、シリコンおよびガラス等の基板、ビーズ等の粒子、試験管やバイアル瓶等の容器、繊維、キャピラリー等を含む管、フィルター、アフィニティカラム、電極等が含まれるが、これに限定されない。該支持体の材質または表面処理は、プローブの固定成績に応じて適宜選ぶのが好ましい。

フラッグは、人為的な配列であるので、プローブ（A + B）のハイブリダイゼーションの特異性が向上するような特性を持つように、配列を設計することが可能である。

例 2 . 検出方法の例

本方法は、複数の標的核酸を同時に検出する場合にも有効である。図 2 に複数の標的核酸 N_1 、 N_2 、 $N_3 \cdots N_n$ （ここで、 n は 2 以上の整数。以下、 $N_1 - N_n$ と称する）を同時に検出する例を示した。

検出対象が複数であることを除けば、各工程および各プローブの構成は、例 1 と同様である（図 2 a から e）。

具体的には、標的核酸 $N_1 - N_n$ と、プローブ $A_1 - A_n$ と、およびプローブ $B_1 - B_n$ を混合する（図 2 a）。次に、これらをハイブリダイゼーションし、プローブ $A_1 - A_n$ とプローブ $B_1 - B_n$ を連結する（図 2 b）。得られたプローブ $(A_1 + B_1) - (A_n + B_n)$ を解離する（図示せず）。次に、プローブ $(A_1 + B_1) - (A_n + B_n)$ を回収する（図 2 c）。フラッグを変性して一本鎖とする（図 2 d）。当該標識物質の結合している一本鎖を回収し、該標識物質を検出または定量する（図 2 e）。これにより複数の種類の標的核酸を一度に、且つ同じ標識物質を用いることにより検出または定量することが可能である。従って、従来よりも少ない工程で複数の標的核酸を容易に検出できる。

同じ標識物質を使用して、複数の標的核酸を識別するには、標識核酸毎にフラッグの配列を変更すればよい。また、図 2 の工程 e、即ち、標識一本鎖の回収に使用する相補的な配列を基板に固相化するとき、配列毎に異なる領域に固相化すればよい。前記フラッグの配列の変更と、領域毎の固相化

を同時に行うことも可能である。

或いは、標的核酸毎に、各々異なる標的物質を結合して使用することも可能である。この場合には、フラッグを変更すること、または領域毎の固相化を行う必要性は必ずしもない。

プローブ $(A_1 + B_1)$ 、 $(A_2 + B_2) \cdots (A_n + B_n)$ [以下、 $(A_1 + B_1) - (A_n + B_n)$ と称する] の F_n' および S_n' 配列の GC 含量や、核酸塩基の組成等を適切に選択すれば、各プローブの至適ハイブリダイゼーション条件（例えば、温度、塩濃度等）のバラツキを抑制することが可能である。また、複数種類のフラッグ配列を用いる場合にも、フラッグ間でのハイブリダイゼーション条件を統一することが好ましい。これにより、検出精度が向上する。更に、 F_n' および S_n' 配列の T_m 値よりフラッグの配列の T_m 値を十分に高くすることにより、検出精度が更に向上する。

これに対して、標的核酸の相補的配列を固相化する従来の核酸検出方法では、固相化されている各プローブの至適ハイブリダイゼーション条件は、一般に異なるので、全プローブに適した条件を設定することは不可能である。

例 3 . 検出方法の例

次に図 3 を参照しながら、本発明の方法の更なる例を説明する。本例の方法は、複数の標的核酸 N_1 、 N_2 、 $N_3 \cdots N_n$ （ここで、 n は 2 以上の整数。以下、 $N_1 - N_n$ と称す

る)を同時に検出する例である。標的核酸 $N_1 - N_n$ に応じて、プローブ A_1 、 A_2 、 $A_3 \cdots A_n$ (n は 2 以上の整数。以下、 $A_1 - A_n$ と称する) とプローブ B_1 、 B_2 、 $B_3 \cdots B_n$ (ここで、 n は 2 以上の整数。以下、 $B_1 - B_n$ と称する) を準備する。これらは、更に以下に示すような特徴を有す核酸プローブである (図 3 a)。

プローブ $A_1 - A_n$ は、該標的核酸 $N_1 - N_n$ の一部の領域における塩基配列 F_1 から F_n に対して相補的な配列 F_1' から F_n' と、夫々の配列 F_1' から F_n' に結合されたタグ T_{g1} から T_{gn} (以下、 $T_{g1} - T_{gn}$ と称す) からなる。本例のタグ T_{g1} から T_{gn} (以下、 $T_{g1}' - T_{gn}'$ と称す) は塩基配列であり、夫々のタグ T_{g1} から T_{gn} は、標的核酸の何れの部分とも結合せず、また標的核酸とどのような相互作用も生じないことが必要である。ここで、タグ T_{g1} から T_{gn} は、直接に配列 F_1' から F_n' に結合しても、または、任意の塩基配列等の何らかの仲介部分を介して間接的に配列 F_1' から F_n' に結合してもよい。例えば、任意の配列をもって間接的に結合させる場合、当該配列は如何なる塩基配列であっても、如何なる塩基数であってもよい。好ましくは、標的核酸上の塩基配列に非相補的である。或いは、他の化学的または物理的な手段により結合されていてもよい。

本発明に使用される配列 F_1' から F_n' は、夫々異なる 1 以上の塩基数を有す。安定なハイブリダイゼーションを達成するためには、好ましくは 15 以上の塩基数を有す。

図 3 a に示すように、プローブ B 1 - B n は、標的核酸の一部の領域の塩基配列 S 1 から S n に相補的な配列 S 1' から S n' と、配列 S 1' から S n' に結合した任意のフラッグ（以下、F L と示す）とからなる。この例では、フラッグは標識物質を含む。上述の例と同様にフラッグは、これ自身が標的核酸と結合はせず、また、これらは互いに如何なる相互作用も示さないことが必要である。本例のプローブ B 1 - B n は、配列 S 1' から S n' に何れかの手段により標識物質が結合される構造である。

本発明で使用される標識物質は、例 1 において記載通りの一般的に標識物質として使用される如何なる物質であってもよい。

本発明に使用される配列 S 1' から S n' は、1 以上の塩基数を有し、好ましくは 15 以上の塩基数を有する。

また、プローブ A 1 - A n に具備される T g と、プローブ B 1 - B n に具備される F L とは、図 3 b に示すように、両プローブが標的核酸の各々目的とする領域に結合したときに、互いに遠方の端に位置するように設計されることが好ましい（図 3 b）。また、プローブ A 1 - A n およびプローブ B 1 - B n は、両プローブが標的核酸の各々目的とする領域に結合したときに、標的核酸の隣り合う塩基に対して相補的な塩基を近方の端に有することが好ましい。これにより、以後の工程におけるライゲーションに有利となる。しかし、これに限定されるものではない。

これらのプローブに含まれる F 1' から F n' および S 1

から S_n の配列は、例えば、GC 含量や核酸塩基の組成等を適切に選択すれば、各プローブの至適ハイブリダイゼーション条件のばらつきを抑制することが可能である。また複数種類のタグ配列を用いる場合にも、タグ間のハイブリダイゼーション条件を統一することが好ましい。さらに F_n および S_n 配列の T_m 値よりタグ配列の T_m 値を十分に高くすることにより、検出感度が向上する。

この例は、以下のように実施する。まず、標的核酸 $N_1 - N_n$ に応じて、上述のようなプローブ $A_1 - A_n$ およびプローブ $B_1 - B_n$ を準備する。これらを適切な割合で、標的核酸 $N_1 - N_n$ と混合する（図 3 a）。

次に、該混合物をハイブリダイゼーションに適した任意の条件で一定時間インキュベーションし、ハイブリダイゼーションを行なう（図示せず）。

該ハイブリダイゼーションは、一般的な何れの手法によっても行なうことが可能である。好ましいハイブリダイゼーションは、先ず、核酸の変性に有効な適宜の高温、例えば、 95°C で 5 分間静置することにより、標的核酸の相補的結合を解除して二本鎖から一本鎖へと変性させる。標的核酸が一本鎖の場合は 70°C で 5 分間静置することにより、その 2 次構造へ変性させる。次に、相補的塩基配列の再結合に有効な適宜の温度、例えば 55°C にて 15 分間静置することにより、一本鎖の標的核酸が、相補的な塩基配列と再び結合するように実施される。

かかるハイブリダイゼーションにより、プローブ $A_1 - A$

n およびプローブ B 1 - B n の両方が、夫々の組毎に同一の標的核酸上に結合してハイブリッドを生成する。従って、使用する緩衝液の種類、温度条件等は、上述の条件に限定される必要はなく、プローブ A 1 - A n およびプローブ B 1 - B n が標的核酸にハイブリダイズする条件であれば、どのような条件であってもよい。

次に、プローブ A 1 - A n およびプローブ B 1 - B n を夫々連結する（図 3 b）。本発明では、標的核酸 N 1 - N n 上にハイブリダイズした状態のプローブ A 1 - A n およびプローブ B 1 - B n を連結し、プローブ（A 1 + B 1）- プローブ（A n + B n）を生成する。この連結は連結部の形成により達成される。この連結は、例 1 と同様に行えばよい。

また、標的核酸上の配列 F と配列 S が、互いに隣接していない場合には、DNA ポリメラーゼ I とリガーゼを用いて、ギャップの充填反応等を行えばよい。それにより、両プローブ間隙に核酸塩基が導入される。使用される DNA ポリメラーゼ I とリガーゼは、一般的に使用される何れのものでもよいが、耐熱性の DNA ポリメラーゼおよびリガーゼが好ましい。

続いて、前記で得たプローブ（A 1 + B 1）-（A n + B n）を標的核酸から解離する（図 3 c）。該解離は、熱的変性等の変性処理により行なえばよい。例えば、熱的変性により行なう場合には、生理的条件下では、85℃以上、好ましくは90℃以上の温度にすればよいが、これに限定されない。

次に、プローブ $(A_1 + B_1) - (A_n + B_n)$ を、夫々の T_{g1} から T_{gn} に相補的な配列 T_{g1}' から T_{gn}' にハイブリダイゼーションすることにより回収する (図 3 d)。その後、標識物質を検出または定量し、標的核酸の検出または定量を達成する (図 3 d)。該検出は、使用した標識物質に応じて、一般的に使用される何れの方法も使用できる。

相補的な配列 T_{g1}' から T_{gn}' は支持体に固定されて使用することが好ましい。使用される支持体には、例えば、シリコンおよびガラス等の基板、ビーズ等の粒子、試験管やバイアル瓶等の容器、繊維、キャピラリー等を含む管、フィルター、アフィニティカラム、電極等が含まれるが、これに限定されない。該支持体の材質または表面処理は、プローブの固定成績に応じて適宜選ぶのが好ましい。

例 3 では、複数の標的核酸についての例を示したが、1 種類の標的核酸についてもこの方法を使用することも可能である。更に、標識物質の種類を増やすことにより、更に多くの種類の標的核酸を簡便に識別することが可能である。

例 4

次に図 4 を参照しながら、本発明の方法の更なる例を説明する。本例の方法は、複数の標的核酸 N_1 、 N_2 、 $N_3 \cdots N_n$ (ここで、 n は 2 以上の整数。以下、 $N_1 - N_n$ と称する) を同時に検出する例である。標的核酸 $N_1 - N_n$ に応じて、プローブ A_1 、 A_2 、 $A_3 \cdots A_n$ (n は 2 以上の整数。以下、 $A_1 - A_n$ と称する) とプローブ B_1 、 B_2 、 B_3

... B_n (ここで、 n は 2 以上の整数。以下、 $B_1 - B_n$ と称する) を準備する。これらは、更に以下に示すような特徴を有す核酸プローブである (図 4 a)。

プローブ $A_1 - A_n$ は、該標的核酸 $N_1 - N_n$ の一部の領域における塩基配列 F_1 から F_n に対して相補的な配列 F_1' から F_n' と、夫々の配列 F_1' から F_n' に結合されたタグ T_{g1} から T_{gn} からなる。本例のタグ T_{g1} から T_{gn} は塩基配列であり、夫々のタグ T_{g1} から T_{gn} は、標的核酸の何れの部分とも結合せず、また標的核酸とどのような相互作用も生じないことが必要である。ここで、タグ T_{g1} から T_{gn} は、直接に配列 F_1' から F_n' に結合しても、または、任意の塩基配列等の何らかの仲介部分を介して間接的に配列 F_1' から F_n' に結合してもよい。例えば、任意の配列をもって間接的に結合させる場合、当該配列は如何なる塩基配列であっても、如何なる塩基数であってもよい。好ましくは、標的核酸上の塩基配列に非相補的である。或いは、他の化学的または物理的な手段により結合されていてもよい。

本発明に使用される配列 F_1' から F_n' は、夫々異なる 1 以上の塩基数を有す。安定なハイブリダイゼーションを達成するためには、好ましくは 15 以上の塩基数を有す。

図 4 a に示すように、プローブ $B_1 - B_n$ は、標的核酸の一部の領域の塩基配列 S_1 から S_n に相補的な配列 S_1' から S_n' と、配列 S_1' から S_n' に結合した任意のフラッグとからなる。この例では、フラッグは任意の塩基配列 FL

1 から F L n と標識物質とを含む。上述の例と同様にフラッグは、これ自身が標的核酸と結合はせず、また、これらは互いに如何なる相互作用も示さないことが必要である。本例のプロープ B 1 - B n は、配列 S 1 ' から S n ' に何れかの手段により標識物質が結合される構造である。

本発明で使用する標識物質は、例 1 において記載した通りの一般的に標識物質として使用される如何なる物質であってもよい。

本発明に使用される配列 S ' は、1 以上の塩基数を有し、好ましくは 15 以上の塩基数を有する。

また、プロープ A 1 - A n に具備される T g と、プロープ B 1 - B n に具備される F L とは、図 4 b に示すように、両プロープが標的核酸の各々目的とする領域に結合したときに、互いに遠方の端に位置するように設計されることが好ましい（図 4 b）。また、プロープ A 1 - A n およびプロープ B 1 - B n は、両プロープが標的核酸の各々目的とする領域に結合したときに、標的核酸の隣り合う塩基に対して相補的な塩基を近方の端に有することが好ましい。これにより、以後の工程におけるライゲーションに有利となる。しかし、これに限定されるものではない。

これらのプロープに含まれる F 1 ' から F n ' および S 1 ' から S n ' の配列は、例えば、GC 含量や核酸塩基の組成等を適切に選択すれば、各プロープの至適ハイブリダイゼーション条件のばらつきを抑制することが可能である。また複数種類のタグ配列およびフラッグ配列を用いる場合にも、タ

グ間およびフラッグ間のハイブリダイゼーション条件を統一することが好ましい。さらに F_n' および S_n' 配列の T_m 値よりもタグ配列およびフラッグ配列の T_m 値を十分に高くすることにより、検出感度が向上する。また一つのタグ配列に対して複数種類のフラッグ配列を用いると互いに区別できる標的核酸の種類を飛躍的に増やすことができる。

この例は、以下のように実施する。まず、標的核酸 $N_1 - N_n$ に応じて、上述のようなプローブ $A_1 - A_n$ およびプローブ $B_1 - B_n$ を準備する。これらを適切な割合で、標的核酸 $N_1 - N_n$ と混合する（図 4 a）。

次に、該混合物をハイブリダイゼーションに適した任意の条件で一定時間インキュベーションし、ハイブリダイゼーションを行なう（図示せず）。

該ハイブリダイゼーションは、一般的な何れの手法によっても行なうことが可能である。好ましいハイブリダイゼーションは、先ず、核酸の変性に有効な適宜の高温、例えば、 95°C で 5 分間静置することにより、標的核酸の相補的結合を解除して二本鎖から一本鎖へと変性させる。次に、相補的塩基配列の再結合に有効な適宜の温度、例えば 55°C にて 15 分間静置することにより、一本鎖の標的核酸が、相補的な塩基配列と再び結合するように実施される。

かかるハイブリダイゼーションにより、プローブ $A_1 - A_n$ およびプローブ $B_1 - B_n$ の両方が、夫々の組毎に同一の標的核酸上に結合してハイブリッドを生成する。従って、使用する緩衝液の種類、温度条件等は、上述の条件に限定され

る必要はなく、プローブ $A_1 - A_n$ およびプローブ $B_1 - B_n$ が標的核酸にハイブリダイズする条件であれば、どのような条件であってもよい。

次に、プローブ $A_1 - A_n$ およびプローブ $B_1 - B_n$ を夫々連結する（図 4 b）。本発明では、標的核酸 $N_1 - N_n$ 上にハイブリダイズした状態のプローブ $A_1 - A_n$ およびプローブ $B_1 - B_n$ を連結し、プローブ $(A_1 + B_1) - (A_n + B_n)$ を生成する。この連結は連結部の形成により達成される。この連結は、例 1 と同様に行えばよい。

また、標的核酸上の配列 F と配列 S が、互いに隣接していない場合には、DNA ポリメラーゼ I とリガーゼを用いて、ギャップの充填反応等を行えばよい。それにより、両プローブ間隙に核酸塩基が導入される。使用される DNA ポリメラーゼ I とリガーゼは、一般的に使用される何れのものでもよいが、耐熱性の DNA ポリメラーゼおよびリガーゼが好ましい。

続いて、前記で得たプローブ $(A_1 + B_1) - (A_n + B_n)$ を標的核酸から解離する（図示せず）。該解離は、熱的変性等の変性処理により行なえばよい。例えば、熱的変性により行なう場合には、生理的条件下では、 85°C 以上、好ましくは 90°C 以上の温度にすればよいが、これに限定されない。

次に、プローブ $(A_1 + B_1) - (A_n + B_n)$ を、夫々の T_{g1} から T_{gn} に相補的な配列 T_{g1}' から T_{gn}' にハイブリダイゼーションすることにより回収する（図 4 c）

。続いて、変性により当該プローブを解離し、その後、F L 1 から F L n の配列に相補的な配列 F L 1 ' から F L n ' にハイブリダイゼーションすることにより回収する（図 4 d）。次に、夫々の標識物質を検出または定量し、標的核酸の検出または定量を達成する（図 4 e）。該検出は、使用した標識物質に応じて、一般的に使用される何れの方法も使用できる。

相補的な配列 T g 1 ' から T g n ' および配列 F L 1 ' から F L n ' は、支持体に固定されて使用することが好ましい。使用される支持体には、例えば、シリコンおよびガラス等の基板、ビーズ等の粒子、試験管やバイアル瓶等の容器、繊維、キャピラリー等を含む管、フィルター、アフィニティカラム、電極等が含まれるが、これに限定されない。該支持体の材質または表面処理は、プローブの固定成績に応じて適宜選ぶのが好ましい。

例 5 . 検出方法の例

以下に、本発明の好ましい更なる例について説明する。以下の方法は、フラッグの設計を工夫することにより、多種類の標的核酸を、高精度に且つ効率よく検出することが可能な方法である。

この方法では、以下に示すような 2 種類の核酸プローブ、即ち、プローブ A およびプローブ B が使用される（図 5 a）

。

プローブ A は、標的核酸の一部の領域の塩基配列 F に相補

的な配列 F' と、これに結合した結合分子からなる。

ここで、結合分子は、互いに特異的に高親和性を有する 2 つの物質の内の何れか一方の物質である。例えば、ビオチンまたはアビジン若しくはストレプトアビジン等である。また、結合分子は、直接に配列 F' に結合しても、或いは任意の配列を解して間接的に配列 F' に結合してもよい。間接的に結合する場合の任意の配列は、如何なる塩基配列であっても、如何なる塩基数であってもよい。好ましくは、標的核酸上の塩基配列に非相補的な配列である。

プローブ B は、標的核酸の一部の領域の塩基配列 S に相補的な配列 S' とフラッグとからなる。本例におけるフラッグは二本鎖からなる。前記二本鎖は、複数のユニットからなる任意の配列を有す。また、フラッグは、これ自身が標的核酸と結合はせず、また、これらは互いに如何なる相互作用も示さないことが必要である。

本方法に使用される配列 F' および配列 S' は、1 以上の塩基数を有し、より好ましくは 15 以上の塩基数を有する。

ユニットの設計例を図 7 に示す。フラッグ FL の複数のユニットの各 1 ユニットは、10 塩基数以上としてよく、より好ましくは約 15 塩基数である。フラッグ FL のユニット数は、何れでもよいが、解析の容易さから 4 ユニットが好ましい。しかし、これに限られるものではない。

複数の標的核酸を同時に検出する場合には、多種類のユニットを組み合わせてフラッグ FL を構築する。たとえば、S D、D 0、D 1、E D の 4 ユニットからなるフラッグ FL を

設計する場合を例とすると、先ず、22種類のユニットを設計し、その中から2種類を選択してプライマーとなるSDユニットと、もう1つのプライマーであるEDユニットとする。残りの20種類のユニットを用いて、各標的核酸の種類毎に、選択する2つのユニットの種類を変えることによりD0、D1を設計すると、100種類の異なる核酸配列を検出することが可能である（図7A）。

22種類のユニットは、正規直交化された塩基配列により設計することが好ましい。正規直交化された塩基配列はTm値が揃っており、相補配列以外とは安定したハイブリッドは形成しない。また、相補配列とのハイブリッド形成を阻害するような安定した2次構造は形成しない。これにより、最終的な検出時のミスハイブリを少なくし、ハイブリの形成速度を上げることが可能になる。したがって、検出精度を向上すること、および検出時間を短縮することが可能になる。また、ユニット数を増すことや、ユニットの種類を増すことにより、10000種類の異なる核酸配列をも検出することが可能である。

図5を用いて、本例の方法を更に説明する。図5aに、4ユニットからなるフラッグFLの例を示した。該4ユニットは、ポリメラーゼ連鎖反応（polymerase chain reaction；以後、PCR増幅またはPCR反応と称す）においてプライマーとなるSDユニットと、標的核酸の種類を認識するための認識用ユニット、即ち、D0ユニットおよびD1ユニットと、およびもう1つのプライマー

配列であるEDユニットとからなる。これらの各ユニットは、後の工程においては、夫々が読み取り枠となる。

検出は、まず上記のプロープAとプロープBを、標的核酸と混合する（図5a）ことにより行う。このとき、試料に含まれる標的核酸は、複数の異なる核酸分子群であってもよい。例えば、検出されるべき標的核酸の種類が100種類以下であるならば、D0ユニットは、D0-1からD0-10の10種類の中から選択され、且つD1ユニットは、D1-1からD1-10の10種類の中から選択される（図7A）。

次に、プロープA、プロープB、および標的核酸をハイブリダイゼーションに適した条件で一定時間インキュベーションし、ハイブリダイゼーションを行なう（図5b）。ハイブリダイゼーションの条件は、例1に示す通りでよい。

かかるハイブリダイゼーションにより、プロープAおよびプロープBの両方が同一の標的核酸上に結合する（図5b）。

次に、標的核酸にハイブリダイズしたプロープAおよびプロープBを連結する（図5c）。連結の条件は、例1に示す通りでよい。

また、フラッグFLのT_m値は、配列F'およびS'より高い温度に設計することが好ましい。これにより本検出方法におけるハイブリダイゼーション、ライゲーションおよび変性等の操作の加熱または冷却の際に、検出感度の低下をもたらすフラッグの変性を防ぐことが可能である。

次に、得られたフラッグFLの情報をB/F分離する。具

体的には、プローブ（A + B）に具備される結合分子を、その対となるべき結合分子を介して固相担体に補足する（図 5 e）。

前記固相担体は、基板、ビーズ等の粒子、容器、繊維、管、フィルター、アフィニティ・カラム、電極等を用いることが可能であるが、好ましくはビーズである。

次に、結合分子に捕捉された状態で、プローブ（A + B）のフラッグ F L を変性し一本鎖にする（図 5 f）。得られた液相中の一本鎖配列 F L' に対して P C R 増幅を行なう（図 5 g）。上述したように、予めフラッグ F L には、2 つのプライマー配列 S D および E D が配置してある。従って、このプライマー配列を利用して P C R 反応が容易に行ない得る。また、このとき、P C R に使用する 2 つのプライマーの一方、たとえば S D 配列に、ビオチン等の結合分子を結合しておくことが好ましい。このときの P C R の詳細な条件は、設計したフラッグ F L に依存する。

続いて、該 P C R 反応の終了後、結合分子を固相した固相担体に結合することによって、P C R 産物である二本鎖配列を回収する（図 5 i）。ここで、固相化された担体は、前記結合分子と対になる結合対のもう一方の物質である。さらに、変性により配列 F L' を除き、一本鎖配列 F L のみを固相担体上で回収する（図 5 i）。

続いて、固相上の一本鎖フラッグ配列 F L の解析を行なう。まず、一本鎖フラッグ配列 F L が結合した前記固相担体を 10 等分する（D 1 ユニットが D 1 - 1 から D 1 - D 10 の

場合)。各々に、標識分子と結合した $D1-1'$ から $D1-10'$ 配列の一つおよび全ての $D0'$ 配列 ($D0-1'$ から $D0-10'$) を加え、フラッグ配列 FL にハイブリダイズする。

続いて、ハイブリダイズした2つの核酸分子をライゲーションにより連結する。ここで、ライゲーションの条件および標識物質に関する定義は上述した通りである。その後、変性により連結された分子を液相に回収する。

得られた標識された核酸分子の解析は、予め $D0-1$ から $D0-10$ の核酸分子を固相化した DNA チップまたは DNA キャピラリー等に対して、ハイブリダイズすることにより行うことができる。特に、 DNA キャピラリーは、 $D0-1$ から $D0-10$ で10等分に分けられたものを同時に処理できるので、これにより分析は容易になるであろう。

例えば、各10種類の $D0-1$ から $D0-10$ と、 $D1-0$ から $D1-10$ の配列を用いてフラッグ FL を設計した場合、図7Aの1の位置には $D0-1$ に相当する配列が固定され、標識された $D1-1'$ 分子と連結された拡散分子63にハイブリダイズされる。同様に、他の位置には列により相当する $D0$ 配列が固定され、行により相当する $D1'$ 分子と連結された拡散分子にハイブリダイズされる。このような行列の配置を、後述する DNA キャピラリーに対して用いる (図7B) と解析が容易に行える。

ここでは、10種類のユニットを用いた例を挙げたが、ユニットの種類は10種類に限られるものではなく、それ以下

でも、それ以上でもよい。

ここで使用する「DNAキャピラリ」とは、標的核酸を検出するための装置であり、その内側に該標的核酸に対する相補的配列が結合されており、該相補的配列に標的核酸を結合することにより、該標的分子を検出する装置をいう。図7Bに示す通り、多数のDNAキャピラリを同時に使用し、且つ斜線で示した部分に、互いに異なるプローブを配置することにより、同時に多くの標的核酸を検出することが可能である。

また、本方法では、フラッグ配列FLの各ユニットには正規直交化配列が使用されているので、実施されるハイブリダイズの反応温度等の条件を均一化することが可能である。これにより、ミスハイブリを防止でき、高い精度が得られる。また、同一条件の下で一度に多くの解析を行なうことが可能であるため、検出時間の短縮化を達成することが可能である。また、本方法により複雑なゲノム情報をDNAの塩基配列で表現した数値に変換することも可能となり、DNA分子反応を利用した計算を行うことにより、多種類の情報や、互いに連鎖した複雑な遺伝子情報を容易に解析することが可能になる。また、コード化したのちに容易にコード化核酸を増幅できるので、少ないコピー数の標的配列であっても正確に且つ定量的に検出することが可能である。また、コード化することにより、多くの情報を圧縮することが可能である。従ってDNAチップまたはキャピラリーアレイ等の検出手段の所要数を節約することが可能である。

ここで使用する「エンコード反応」とは、ある塩基配列を、正規直交化塩基配列で表現されるコードに変換することをいう。上述の図5 a から f の工程がこれに相当する。

また、ここで使用する「デコード反応」とは、前記で変換されたコードの読み取りを行ない、それにより元の情報を復元することをいう。上述の図5 j の工程がこれに相当する。

上記の例5では、1種類の標的核酸を検出する例を示したが、複数種類のフラッグ配列を設計すれば、同様な工程を経ることにより複数種類の標的核酸を同時に検出することも可能である。

また、例5の応用例を図6に示す。図6に示した例では、検出する標的核酸に応じて、D01-D11からD01-D1n（ここで、nは整数である）を含むフラッグ配列が設計される。これを例5の工程aからfと同様に処理し、更に、以下のようなデコード反応を行う（図6）。即ち、得られた一本鎖配列FL'に対して、2つのプライマー配列SDおよびEDを用いて、PCR反応を行う（図6g）。ここで図6gからiの工程は、多種類のプローブ等を代表してnについて図示したが、この工程では、1からnの多種類のプローブ等も同様に存在していると理解されるべきである。また、このとき、SD配列にはビオチン等の結合分子を結合しておくことが好ましい。のときのPCRの詳細な条件は、設計したフラッグFLに依存してよい。得られた二本鎖を前記結合分子と対となる物質を用いて回収する（図6h）。これを変性し、洗浄して一本鎖にする（図6i）。続いて、夫々のFL

配列の $D_{11} - D_{1n}$ に相補的であり、且つ標識物質を付与されたプライマーをハイブリダイズして伸長する（図 6 j）。得られた各 $D_{11}' - D_{1n}'$ を、 $D_{01} - D_{1n}$ が固相されたチップまたはキャピラリーアレイを用いることによって検出する（図 6 k）。また、当該反応は、以下のような方法によっても実施することが可能である。即ち、プローブ A とプローブ B を連結し、プローブ B に付与した結合物質または $T_g n$ 配列を利用して B/F 分離を行った後で、PCR を行わずに、得られた FL を直接に検出することも可能である。この場合にも、 S_n' に連結する配列は、2 ユニットでもよい。また、その場合には、 D_{0n} 配列および D_{1n} 配列を DNA チップまたはキャピラリーアレイに固相化して用いてもよい。この場合の検出は、予め当該 FL 配列毎に異なる上述の標識物質を付与しておいても、または、DNA チップ等の所望する領域に配列毎に結合した後に標識物質を付与してもよい。

例 6 . 実験

本発明の方法が、実際に有用であることを示すために以下のような実験を行なった。使用した配列と、その結合様式を図 8 に示す。

（1）標的配列と変異配列

使用する標的配列は、 $r - 32 - f1$ を用いた（図 9）。また、検出方法の特異性を確認するために該標的配列とその配列が異なる変異配列を使用した。変異配列は、 $f1 - ne$

g - r - 3 2 A B である (図 9)。

(2) プローブと検出用配列

プローブ A は、b - 1 6 A を用いた (図 9)。プローブ A に含まれる b は、ビオチンを示す。また、プローブ B は、P - 1 6 B - 4 8 を用いた (図 9)。プローブ B は、フラッグ F L を含み、P はリン酸基を示す。プローブ B の F L 配列に相補的な配列が、検出用配列であり、fl-r-48 を使用した (図 9)。

(3) 実験方法

上記のプローブ等を用いて、標的配列の検出を試みた。先ず、夫々、p H 8. 0 の T E 緩衝液中で 5 0 0 p m o l のプローブ B 溶液と、同量の検出用配列の溶液を混合し、9 5 °C で 1 分間インキュベーションし、その後、7 分間かけて 2 5 °C とし二本鎖とした。

次に、得られた二本鎖化したプローブ B と、標的配列と、プローブ A とを混合し、1 0 0 μ l のライゲーション用緩衝液中で 2 0 U の T a g D N A リガーゼ (N e w E n g l a n d B i o l a b 社製) を用いてライゲーション反応を行った。この反応は、7 0 °C から 5 5 °C まで 5 分間かけて温度を下げることでプローブ A およびプローブ B を標的配列にアニールさせたのち、T a g D N A リガーゼを添加して、5 5 °C で 1 5 分間ライゲーション反応を行い、次いで、室温に温度を下げることににより進行した。ストレプト アビジンを固相した磁気ビーズに上記のライゲーション後の試料を加え、3 0 °C でプレコールドウォッシュ (pre-cold wash)

を行ない、未反応の標的配列を除去し、同一温度でコールドウォッシュを行ない標的配列を除去した。上清を除去した後、TE緩衝液を100 μ l添加し、70℃で洗浄、即ち、ホットウォッシュ (hot wash) を行ない、検出用配列を回収した。

(4) . 実験結果

以下に検出結果を示す。図10は、各々の洗浄過程において上清から得られた配列をキャピラリー電気泳動により検出したものである。プレウォッシュで回収された上清には、ライゲーション反応に付されなかった標的配列が含まれることが示された。また、コールドウォッシュにより回収された上清には、ライゲーションに付された塩基配列の標的配列が含まれることが示された。また、ホットウォッシュにより回収された上清中には、検出用配列が含まれ、その塩基長に相応する長さのDNAが検出されたことが示された。

図11は、標的配列の濃度と回収された検出用配列の濃度との関係を示す結果である。これは、上述の方法において添加した標的配列の濃度を、0、5、10、20、25および50 nMと変えた場合に検出された検出用配列の回収率をパーセンテージで示したグラフである。グラフから明らかであるように、標的配列の濃度が増加するに従い、検出された検出用配列の回収率も増加した。このことは、本検出方法が有用であることの証明の1つである。

図12は、本方法の特異性について検討した結果を示す。即ち、標的配列の一部の塩基配列が異なる変異配列を検出系

に存在した場合の、検出用配列の回収率について示す結果である。上述の方法において、標的配列を添加すると同時に、変異配列を 0.05、0.5 および 1 μ M で添加した。その結果、図 12 に示す通り、変異配列の存在は、検出用配列の回収率に影響を与えなかった。従って、本検出方法は、標的配列を特異的に検出できることが証明された。

例 7. 実験

本発明の方法、特に、エンコード反応とデコード反応の特異性と定量性について示すために以下のような実験を行なった。使用した配列を図 13 A に示す。また、各プローブと、これを構成する要素との対応を図 13 B に示す。

7-1. エンコード反応の特異性

(1) 実験方法

まず、IGTP のプローブ B_{IGTP} ($S'_{IGTP} + SD + D0_{IGTP} + D1_{IGTP} + ED$, 0.3nM)、および LRG-47 のプローブ B_{LRG-47} ($S'_{LRG-47} + SD + D0_{LRG-47} + D1_{IGTP} + ED$, 0.3nM)、IGTP のプローブ A_{IGTP} (0.3nM)、標的遺伝子としての IGTP 遺伝子を 0.3nM から 0.003nM を、Taq DNA リガーゼ (TaqDNA ligase, New England Biolab 社) に添付のライゲーシオン緩衝液中で混合した。得られた混合液の温度を、70℃ から 1 分間当たり 3℃ の割合で下げ、55℃ になったところで 20 ユニットの リガーゼを添加し、総量を 30 μ L とした。その後、ライゲーシオン反応を 15 分間行なった。その後、10 mg/mL のダイナビーズ M-280 ス

トレプトアビジン(Dynabeads M-280 streptavidin)を1 μ Lで添加して、15分間混合した。上清を除去した後、T r i s E D T A 緩衝液(以下、T Eを略す)を20 μ L添加した。これを60℃で洗浄し、未反応のプロープA、プロープBおよび標的核酸配列を洗浄した(即ち、コールドウォッシュまたは室温洗浄である)この洗浄を2回行った。上清を除去した後、20 μ LのT Eを添加した。95℃で、エンコードされたフラッグ配列を回収した。L R G - 4 7 に対するエンコード反応についても、同様に、標的遺伝子であるL R G - 4 7 遺伝子に対応するプロープAとプロープBとを、ライゲーションすることによって評価を行った。エンコード反応を行うことにより連結されたプロープに対して、S D 配列とE D 配列を各々プライマーとして使用して、P C R を行った。本鎖用のキャピラリー電気泳動により計測した。

(2) . 実験結果

図15は、上述で行った試験の概要を示すスキーム図である。以下に検出結果を示す。図14AおよびBは、キャピラリー電気泳動に供した場合に得られる結果をしたものである。図14AおよびBに示す通り、本発明のエンコード反応により、各々のF L 配列に対して特異的なP C R 増幅が達成され、それによって特異的なP C R 産物が得られた。

7-2. エンコード反応後のP C R 増幅の定量性

(1) 実験方法

エンコード反応後に行うP C R の一様性と定量性を以下の方法を用いて検証した。本試験は、上述の通りのI G T P を

検出するためのフラッグ配列とLRG-47を検出するためのフラッグ配列について行った。IGTPおよびLRG-47を検出するためのフラッグ配列は、各々SD配列とED配列を含む。従って、IGTP用のフラッグ配列と、LRG-47用のフラッグ配列について、SD配列およびED配列を用いて、各々PCRを行った。このPCRに添加した両配列鎖は、夫々100 pMから10 fMとした。また、このPCRは、94℃で30秒、65℃で60秒、72℃で30秒を25回繰り返した。

(2) 実験結果

図17は、上述で行った試験の概要を示すスキーム図である。以下に検出結果を示す。図15は、キャピラリー電気泳動に供した場合に得られる結果をしたものである。図16に示す通り、本発明のエンコード反応後のPCR増幅量は標的配列の濃度依存していることが示された。

7-3. デコード反応の特異性と定量性

(1) 実験方法

使用した配列は、上述した通りである。即ち、ビオチン化したSD+D0_{IGTP}+D1_{IGTP}+ED配列（以下、b-code1とも称す）と、ビオチン化したSD+D0_{LRG-47}+D1_{LRG-47}+ED配列（以下、b-code2とも称す）について、デコード反応を行った。夫々100 μMの濃度のb-code1およびb-code2の0.2 μLと、1MのNaClを含有するTE緩衝液49.8 μLと、40 μLの10 mg/mLのダイナビーズM-280ストレプトアビジンとを

混合し、15分間攪拌した。これを室温で洗浄して、その上清を除去した。得られた当該ビーズに、更に50 μ LのTE緩衝液を添加して室温で洗浄した。上清を除去し、得られたビーズに更に50 μ LのTE緩衝液を添加して、80℃で洗浄し、その上清を除去した。その後、ライゲーシオン緩衝液を用いて、室温で洗浄し、その上清を除去した。続いて、D1に対するリバーズ鎖を、最終濃度で400nm、並びにD0_{IGTP}およびD0_{LRG-47}に対するリバーズ鎖を、最終濃度で各々400nmになるように当該得られたビーズに添加した。これを95℃に加温して一本鎖化を行い、次に、1分間当たり7℃の割合で温度を下げた。続いて、60℃で20ユニットのTaqリガーゼを添加してライゲーシオン反応を15分間行った。その上清を除去した後、50 μ LのTE緩衝液を添加して、室温で洗浄した。その上清を除去し、再度、50 μ LのTE緩衝液を添加した。この温度を80℃に加温し、その上清を回収することによって、前記ライゲーシオンしたプローブを回収した。得られた上清に、上記のストレプトアビジンビーズの40 μ Lを添加し、更に、1MのNaClを含有するTE緩衝液12.5 μ Lを添加して、15分間攪拌した。その後、80℃で上清を回収し、2本のチューブに前記上清を各20 μ Lずつ分注した。前記2本のチューブの各々に対して、ビオチン化したD0_{IGTP}に対応する配列を持ったプローブ(即ち、b-1)と、ビオチン化したD0_{LRG-47}に対応する配列を持ったプローブ(即ち、b-2)を、各々、100 μ molずつ各チューブに添加し、更に、2

MのNaClを含有する1'6 μ LのTE緩衝液を添加した。これを95℃に加温した。その後、1分間当たり10℃の割合で25℃まで温度を下げるによりハイブリダイゼーションを行った。この溶液に、40 μ Lの上記のストレプトアビジンビーズを添加し、15分間攪拌した。その後、上清を除去し、40 μ LのTE緩衝液を添加して、室温で洗浄した。その上清を除去し、更なる40 μ LのTE緩衝液を添加して、40℃で洗浄した。その上清を除去し、更なる40 μ LのTE緩衝液を添加して70℃まで加温した。その上清を回収し、各々、一本鎖用のキャピラリー電気泳動を行った。

(2) 実験結果

図19は、上述で行った試験の概要を示すスキーム図である。以下に検出結果を示す。図18AおよびBは、キャピラリー電気泳動に供した場合に得られる結果をしたものである。本発明のデコードは、当該エンコード反応により増幅したPCR産物に対して、各々の遺伝子に対応したD1、ラベルしたD2配列を用いて連結反応を行った。ビオチン標識したD1_{IGTP}およびD1_{LRG-47}を用いて、連結反応が起こったプローブを検出した結果、図17に示す通り、各々の遺伝子に対応した産物を特異的に検出することが可能であることが示された。

請 求 の 範 囲

1. 試料中の所定の配列を有する標的核酸を検出または定量する方法であって、

(a) 以下のプローブ A とプローブ B を準備する工程と ;

前記標的核酸中の第 1 の部分配列 F に相補的な配列 F' と、この F' に連結された結合分子とを含む第 1 のプローブであるプローブ A、および

前記標的核酸中の第 2 の部分配列 S に相補的な配列 S' と、この S' に連結されたフラッグとを含む第 2 のプローブであるプローブ B [ここで、前記フラッグは、二本鎖配列であり、その一方の鎖には標識物質が含まれる] ;

(b) 前記標的核酸中の前記第 1 の部分配列 F に前記第 1 のプローブ A をハイブリダイズさせると共に、前記第 2 の部分配列 S に前記第 2 のプローブ B をハイブリダイズさせる工程と、

(c) 前記標的核酸にハイブリダイズした前記第 1 のプローブ A と前記第 2 のプローブ B を連結してプローブ (A + B) を生じる工程と、

(d) 前記結合分子を、これと対をなす結合対のもう一方の物質に結合させることによって前記プローブ (A + B) を回収する工程と、並びに

(e) 前記フラッグを構成する二本鎖核酸のうち、標識物質を含む一本鎖を回収し、前記標識物質を検出または定量

することによって、前記試料中の標的核酸を検出または定量する工程と
を具備する方法。

2. 試料中の所定の配列を有する標的核酸群 $N_1 - N_n$ (n は 2 以上の整数) を検出または定量する方法であって、

(a) 以下のプローブ群 $A_1 - A_n$ (n は 2 以上の整数) とプローブ群 $B_1 - B_n$ (n は 2 以上の整数) を準備する工程と；

前記標的核酸中の第 1 の部分配列 $F_1 - F_n$ (n は 2 以上の整数) に相補的な配列 $F_1' - F_n'$ (n は 2 以上の整数) と、この $F_1' - F_n'$ に連結された結合分子とを含む第 1 のプローブ群であるプローブ群 $A_1 - A_n$ 、および

前記標的核酸中の第 2 の部分配列 $S_1 - S_n$ (n は 2 以上の整数) に相補的な配列 $S_1' - S_n'$ (n は 2 以上の整数) と、この $S_1' - S_n'$ に連結されたフラッグとを含む第 2 のプローブ群であるプローブ群 $B_1 - B_n$ [ここで、前記フラッグは、二本鎖配列であり、その一方の鎖には標識物質が含まれる、 n は 2 以上の整数]；

(b) 前記標的核酸中の前記第 1 の部分配列 $F_1 - F_n$ に前記第 1 のプローブ群 $A_1 - A_n$ をハイブリダイズさせると共に、前記第 2 の部分配列 $S_1 - S_n$ に前記第 2 のプローブ群 $B_1 - B_n$ をハイブリダイズさせる工程と、

(c) 前記標的核酸にハイブリダイズした前記第 1 のプローブ群 $A_1 - A_n$ と前記第 2 のプローブ群 $B_1 - B_n$ を夫

々連結してプローブ $(A_1 + B_1) - (A_n + B_n)$ (n は 2 以上の整数) を生じる工程と、

(d) 前記結合分子を、これと対をなす結合対のもう 1 方の物質に結合させることによって前記プローブ群 $(A_1 + B_1) - (A_n + B_n)$ を回収する工程と、並びに

(e) 前記フラッグを構成する二本鎖核酸のうち、標識物質を含む一本鎖を回収し、前記標識物質を検出または定量することによって、前記試料中の標的核酸群 $N_1 - N_n$ を各々検出または定量する工程とを具備する方法。

3. 試料中の所定の配列を有する標的核酸を検出または定量する方法であって、

(a) 以下のプローブ A とプローブ B を準備する工程と；

前記標的核酸中の第 1 の部分配列 F に相補的な配列 F' と、この F' に連結されたタグ配列 T_g とを含む第一のプローブであるプローブ A、および

前記標的核酸中の第 2 の部分配列 S に相補的な配列 S' と、この S' に連結された標識物質とを含む第二のプローブであるプローブ B；

(b) 前記プローブ A と、前記プローブ B と、前記試料とを混合して、前記標的核酸中の前記第 1 の部分配列 F に前記プローブ A をハイブリダイズさせると共に、前記第 2 の部分配列 S に前記プローブ B をハイブリダイズさせる工程と、

(c) 前記標的核酸にハイブリダイズした前記プローブ

Aと前記プローブBをライゲートして、プローブ(A+B)を生じる工程と、

(d) 得られたプローブ(A+B)と前記標的核酸とを解離する工程と、

(e) 前記タブ配列 T_g を該配列と相補的な配列 T_g' にハイブリダイズさせることにより、前記プローブ(A+B)を回収する工程と、および

(f) 回収した前記プローブ(A+B)中の前記標識物質を検出または定量することにより、前記試料中の標的核酸を検出または定量する工程とを具備する方法。

4. 試料中の所定の配列を有する標的核酸群 $N_1 - N_n$ を検出または定量する方法であって、

(a) 以下のプローブ群 $A_1 - A_n$ (n は2以上の整数)とプローブ群 $B_1 - B_n$ (n は2以上の整数)を準備する工程と；

前記標的核酸群 $N_1 - N_n$ (n は2以上の整数)中の第1の部分配列 $F_1 - F_n$ に相補的な配列 $F_1' - F_n'$ (n は2以上の整数)と、この $F_1' - F_n'$ に連結されたタブ配列 $T_{g1} - T_{gn}$ とを含む第一のプローブ群であるプローブ群 $A_1 - A_n$ 、および

前記標的核酸群 $N_1 - N_n$ 中の第2の部分配列 $S_1 - S_n$ (n は2以上の整数)に相補的な配列 $S_1' - S_n'$ (n は2以上の整数)と、この $S_1' - S_n'$ に連結された標識物質とを含む第二のプローブ群であるプローブ群 B_1

— B_n ;

(b) 前記プローブ群 A₁ — A_n と、前記プローブ群 B₁ — B_n と、前記試料とを混合して、前記標的核酸群 N₁ — N_n 中の前記第 1 の部分配列 F₁ — F_n に前記プローブ A₁ — A_n をハイブリダイズさせると共に、前記第 2 の部分配列 S₁ — S_n に前記プローブ B₁ — B_n をハイブリダイズさせる工程と、

(c) 前記標的核酸群にハイブリダイズした前記プローブ群 A₁ — A_n と前記群プローブ B₁ — B_n を夫々連結して、プローブ群 (A₁ + B₁) — (A_n + B_n) (n は 2 以上の整数) を生じる工程と、

(d) 得られたプローブ群 (A₁ + B₁) — (A_n + B_n) と前記標的核酸とを解離する工程と、

(e) 前記タグ配列 T_{g1} — T_{gn} を該配列と相補的な配列 T_{g1}' — T_{gn}' にハイブリダイズさせることにより、前記プローブ群 (A₁ + B₁) — (A_n + B_n) を回収する工程と、および

(f) 回収した前記プローブ群 (A₁ + B₁) — (A_n + B_n) 中の前記標識物質を検出または定量することにより、前記試料中の標的核酸群 N₁ — N_n を各々、検出または定量する工程と

を具備する方法。

5. 試料中の所定の配列を有する標的核酸を検出または定量する方法であって、

(a) 以下のプローブ A とプローブ B を準備する工程と

;

前記標的核酸中の第 1 の部分配列 F に相補的な配列 F' と、この F' に連結された任意の配列であるタグ配列 T_g とを含む第一のプロープであるプロープ A、および

前記標的核酸中の第 2 の部分配列 S に相補的な配列 S' と、この S' に連結されたフラッグ配列 F_L と、前記フラッグ配列 F_L に連結された標識物質とを含む第二のプロープであるプロープ B ;

(b) 前記プロープ A と、前記プロープ B と、前記試料とを混合して、前記標的核酸中の前記第 1 の部分配列 F に前記プロープ A をハイブリダイズさせると共に、前記第 2 の部分配列 S に前記プロープ B をハイブリダイズさせる工程と、

(c) 前記標的核酸にハイブリダイズした前記プロープ A と前記プロープ B をライゲートして、プロープ (A + B) を生じる工程と、

(d) 得られたプロープ (A + B) と前記標的核酸とを分離する工程と、

(e) プロープ (A + B) に含まれるタグ配列 T_g を、その配列に相補的な配列 T_g' にハイブリダイズすることにより分離する工程と、

(f) 前記タグ配列 T_g' にハイブリダイズしたプロープ (A + B) から、少なくともプロープ B を含む部分を回収する工程と、

(g) 回収されたフラッグ配列 F_L を、その配列に相補的な核酸配列 F_L' にハイブリダイズすることにより特異的

に回収する工程と、および

(h) 回収した少なくともプローブ B を含む部分に含まれる標識物質を選択的に検出することにより前記試料中の標的核酸を検出または定量する工程とを具備する方法。

6. 試料中の所定の配列を有する標的核酸群 $N_1 - N_n$ (n は 2 以上の整数) を検出または定量する方法であって、

(a) 以下のプローブ群 $A_1 - A_n$ (n は 2 以上の整数) とプローブ群 $B_1 - B_n$ (n は 2 以上の整数) を準備する工程と;

前記標的核酸群 $N_1 - N_n$ (n は 2 以上の整数) 中の第 1 の部分配列 $F_1 - F_n$ (n は 2 以上の整数) に相補的な配列 $F_1' - F_n'$ (n は 2 以上の整数) と、この $F_1' - F_n'$ に連結された任意の配列であるタグ配列 $T_{g1} - T_{gn}$ (n は 2 以上の整数) とを含む第一のプローブ群であるプローブ群 $A_1 - A_n$ 、および

前記標的核酸群 $N_1 - N_n$ 中の第 2 の部分配列 $S_1 - S_n$ (n は 2 以上の整数) に相補的な配列 $S_1' - S_n'$ (n は 2 以上の整数) と、この $S_1' - S_n'$ に連結されたフラッグ配列 $FL_1 - FL_n$ と、前記フラッグ配列 $FL_1 - FL_n$ に連結された標識物質とを含む第二のプローブ群であるプローブ群 $B_1 - B_n$;

(b) 前記プローブ群 $A_1 - A_n$ と、前記プローブ群 $B_1 - B_n$ と、前記試料とを混合して、前記標的核酸群 $N_1 - N_n$ 中の前記第 1 の部分配列 $F_1 - F_n$ に前記プローブ A_1

— A_n をハイブリダイズさせると共に、前記第 2 の部分配列 $S_1 - S_n$ に前記プローブ分 $B_1 - B_n$ をハイブリダイズさせる工程と、

(c) 前記標的核酸にハイブリダイズした前記プローブ群 $A_1 - A_n$ と前記プローブ群 $B_1 - B_n$ を、夫々、連結して、プローブ群 $(A_1 + B_1) - (A_n + B_n)$ (n は 2 以上の整数) を生じる工程と、

(d) 得られたプローブ群 $(A_1 + B_1) - (A_n + B_n)$ と前記標的核酸とを分離する工程と、

(e) プローブ群 $(A_1 + B_1) - (A_n + B_n)$ に含まれるタグ配列 $T_{g1} - T_{gn}$ を、その配列に相補的な配列 $T_{g1}' - T_{gn}'$ にハイブリダイズすることにより分離する工程と、

(f) 前記タグ配列 $T_{g1}' - T_{gn}'$ にハイブリダイズしたプローブ群 $(A_1 + B_1) - (A_n + B_n)$ から、少なくともプローブ群 $B_1 - B_n$ を含む部分を回収する工程と、

(g) 回収されたフラッグ配列 $FL_1 - FL_n$ を、その配列に相補的な核酸配列 $FL_1' - FL_n'$ にハイブリダイズすることにより特異的に回収する工程と、および

(h) 回収した少なくともプローブ群 $B_1 - B_n$ を含む部分に含まれる標識物質を選択的に検出することにより前記試料中の標的核酸群 $N_1 - N_n$ を夫々検出または定量する工程と

を具備する方法。

7. 所定の配列を有する試料中の標的核酸群 $N_1 - N_n$

(n は 2 以上の整数) を検出または定量する方法であって、

(a) 以下のプローブ群 $A_1 - A_n$ (n は 2 以上の整数) とプローブ群 $B_1 - B_n$ (n は 2 以上の整数) を準備する工程と;

前記標的核酸群 $N_1 - N_n$ 中の第 1 の部分配列 $F_1 - F_n$ (n は 2 以上の整数) に相補的な配列 $F_1' - F_n'$ (n は 2 以上の整数) と、各 $F_1' - F_n'$ に連結されたタグ配列 $T_{g1} - T_{gn}$ (n は 2 以上の整数) を備えた第一のプローブである群プローブ群 $A_1 - A_n$ と、

前記標的核酸群 $N_1 - N_n$ 中の第 2 の部分配列 $S_1 - S_n$ (n は 2 以上の整数) に相補的な配列 $S_1' - S_n'$ (n は 2 以上の整数) と、各 $S_1' - S_n'$ に連結された標識物質とを備えた第二のプローブであるプローブ群 $B_1 - B_n$ と

(b) 前記プローブ群 $A_1 - A_n$ と、前記プローブ群 $B_1 - B_n$ と、前記試料とを混合して、前記標的核酸群 $N_1 - N_n$ 中の前記第 1 の部分配列 $F_1 - F_n$ に前記プローブ群 $A_1 - A_n$ をハイブリダイズさせるとともに、前記第 2 の部分配列 $S_1 - S_n$ に前記プローブ群 $B_1 - B_n$ をハイブリダイズさせる工程と、

(c) 前記標的核酸群 $N_1 - N_n$ にハイブリダイズした前記プローブ群 $A_1 - A_n$ と前記プローブ群 $B_1 - B_n$ を夫々連結して、プローブ群 $(A_1 + B_1) - (A_n + B_n)$ (n は 2 以上の整数) を生じる工程と、

(d) 前記タグ $T_{g1} - T_{gn}$ を該配列と相補的な配列

$T_{g1}' - T_{gn}'$ にハイブリダイズさせることにより、前記プローブ $(A_1 + B_1) - (A_n + B_n)$ を回収する工程と、

(e) 回収した前記プローブ群 $(A_1 + B_1) - (A_n + B_n)$ 中の前記標識物質を検出または定量することにより、前記試料中の標的核酸群 $N_1 - N_n$ を検出または定量する工程と、

を具備し、かつ前記タグ $T_{g1} - T_{gn}$ の T_m 値が配列 $F_1 - F_n$ および配列 $S_1 - S_n$ の T_m 値よりも高値となるように設定されていることを特徴とする方法。

8. 所定の配列を有する試料中の標的核酸を検出または定量する方法であって、

(a) 以下のプローブ A とプローブ B を準備する工程と；

前記標的核酸中の第 1 の部分配列 F に相補的な配列 F' と、各 F' に連結された結合分子とを含む第 1 のプローブであるプローブ A、および

前記標的核酸中の第 2 の部分配列 S に相補的な配列 S' と、各 S' に連結された 4 ユニットからなるフラッグ配列 FL とを備えた第二のプローブ群であるプローブ B [ここで、前記フラッグ配列 FL は、前記配列 S' に連結する配列 FL' とハイブリダイズしてる二本鎖配列である]；

(b) 前記プローブ A と、前記プローブ B と、前記試料とを混合して、前記標的核酸中の前記第 1 の部分配列 F に前記プローブ A をハイブリダイズさせるとともに、前記第 2 の

部分配列 S に前記プローブ B をハイブリダイズさせる工程と

(c) 前記標的核酸にハイブリダイズした前記プローブ A と前記プローブ B を夫々連結して、プローブ (A + B) を生じる工程と、

(d) 前記結合分子を、これと対をなす結合対のもう一方の物質に結合することによりプローブ (A + B) を回収する工程と、

(e) 前記回収されたプローブ群 (A + B) の二本鎖フラッグ配列を変性により一本鎖にすることと、

(f) 前記一本鎖のフラッグ配列 FL について 2 つのプライマー [そのうちの 1 つは結合分子 B を有し、他方は標識物質 L を有する] をハイブリダイズして伸長することによって、フラッグ配列 FL の相補鎖を形成して二本鎖を得る工程と、

(g) 前記結合分子 B をこれと対をなす結合対のもう一方の物質に結合することにより、前記二本鎖を回収する工程と、

(h) 前記標識物質 L を検出または定量することにより前記試料中の標的核酸を検出または定量する工程とを具備する方法。

9. 所定の配列を有する試料中の標的核酸 $N_1 - N_n$ (n は 2 以上の整数) を検出または定量する方法であって、

(a) 以下のプローブ群 $A_1 - A_n$ (n は 2 以上の整数) とプローブ群 $B_1 - B_n$ (n は 2 以上の整数) を準備する

工程と；

前記標的核酸 $N_1 - N_n$ 中の第 1 の部分配列 $F_1 - F_n$ (n は 2 以上の整数) に相補的な配列 $F_1' - F_n'$ (n は 2 以上の整数) と、各 $F_1' - F_n'$ に連結された結合分子とを含む第 1 のプローブ群であるプローブ群 $A_1 - A_n$ 、および

前記標的核酸 $N_1 - N_n$ 中の第 2 の部分配列 $S_1 - S_n$ (n は 2 以上の整数) に相補的な配列 $S_1' - S_n'$ (n は 2 以上の整数) と、各 $S_1' - S_n'$ に連結された 4 ユニットからなるフラッグ配列 $FL_1 - FL_n$ とを備えた第二のプローブ群であるプローブ群 $B_1 - B_n$ [ここで、前記フラッグ配列 $FL_1 - FL_n$ は、前記配列 $S_1' - S_n'$ に連結する配列 $FL_1' - FL_n'$ とハイブリダイズしてる二本鎖配列である]；

(b) 前記プローブ群 $A_1 - A_n$ と、前記プローブ群 $B_1 - B_n$ と、前記試料とを混合して、前記標的核酸群 $N_1 - N_n$ 中の前記第 1 の部分配列 $F_1 - F_n$ に前記プローブ群 $A_1 - A_n$ をハイブリダイズさせるとともに、前記第 2 の部分配列 $S_1 - S_n$ に前記プローブ群 $B_1 - B_n$ をハイブリダイズさせる工程と、

(c) 前記標的核酸群 $N_1 - N_n$ にハイブリダイズした前記プローブ群 $A_1 - A_n$ と前記プローブ群 $B_1 - B_n$ を夫々連結して、プローブ群 $(A_1 + B_1) - (A_n + B_n)$ を生じる工程と、

(d) 前記結合分子を、これと対をなす結合対のもう 1

方の物質に結合することによりプローブ群 $(A_1 + B_1) - (A_n + B_n)$ を回収する工程と、

(e) 前記回収されたプローブ群 $(A_1 + B_1) - (A_n + B_n)$ の二本鎖フラッグ配列を変性により一本鎖にすることと、

(f) 前記一本鎖のフラッグ配列 $FL_1 - FL_n$ について2つのプライマー [そのうちの1つは結合分子Bを有し、他方は標識物質Lを有する] をハイブリダイズして伸長することによって、フラッグ配列 $FL_1 - FL_n$ の相補鎖を形成して二本鎖を得る工程と、

(g) 前記結合分子Bをこれと対をなす結合対のもう一方の物質に結合することにより、前記二本鎖を回収する工程と、

(h) 前記標識物質Lを検出または定量することにより前記試料中の標的核酸群 $N_1 - N_n$ を検出または定量する工程とを具備する方法。

10. 所定の配列を有する試料中の標的核酸を検出または定量する方法であって、

(a) 以下のプローブAとプローブBを準備する工程と；

前記標的核酸中の第1の部分配列Fに相補的な配列F'と、F'に連結された結合分子を備えた第1のプローブであるプローブA、および

前記標的核酸中の第2の部分配列Sに相補的な配列S'と、各S'に連結された4ユニットからなる配列から

構成されたフラッグとを備えた第二のプロープであるプロープ B [ここで、前記フラッグは二本鎖配列である] ;

(b) 前記第 1 のプロープ A と、前記第 2 のプロープ B と、前記試料とを混合して、前記標的核酸中の前記第 1 の部分配列 F に前記プロープ A をハイブリダイズさせるとともに、前記第 2 の部分配列 S に前記プロープ B をハイブリダイズさせる工程と、

(c) 前記標的核酸にハイブリダイズした前記プロープ A と前記プロープ B をライゲートして、プロープ (A + B) を生じる工程と、

(d) 前記結合分子を、これと対をなす結合対のもう一方の物質に結合させることによってプロープ (A + B) を回収する工程と、

(e) 前記フラッグを構成する二本鎖核酸を変性することにより一本鎖にする工程と、

(f) 液相に存在する前記一本鎖を PCR 増幅することによりエンコード反応を行う工程と、

(g) 前記エンコード反応により得られた一本鎖フラッグ配列に相補的な配列 F L' を 2 つのプライマー、即ち、更なる結合分子を有するプライマーと、標識物質を有したプライマーとを用いて転写することによりデコード反応を行う工程と、

(h) 前記更なる結合分子をこれと対をなす結合対のもう一方の物質に結合することにより、デコード反応により得られた核酸分子を回収する工程と、

(i) 前記標識物質を検出または定量することにより当該標的核酸を検出または定量する工程とを具備する方法。

11. 所定の配列を有する試料中の標的核酸 $N_1 - N_n$ (n は 2 以上の整数) を検出または定量する方法であって、

(a) 以下のプローブ群 $A_1 - A_n$ (n は 2 以上の整数) とプローブ群 $B_1 - B_n$ (n は 2 以上の整数) を準備する工程と；

前記標的核酸 $N_1 - N_n$ 中の第 1 の部分配列 $F_1 \sim F_n$ (n は 2 以上の整数) に相補的な配列 $F_1' - F_n'$ (n は 2 以上の整数) と、各 $F_1' - F_n'$ に連結された結合分子を備えた第一のプローブ群であるプローブ群 $A_1 - A_n$ 、および

前記標的核酸 $N_1 - N_n$ 中の第 2 の部分配列 $S_1 \sim S_n$ (n は 2 以上の整数) に相補的な配列 $S_1' - S_n'$ (n は 2 以上の整数) と、各 $S_1' - S_n'$ に連結された 4 ユニットからなるフラッグ $FL_1 - FL_n$ (n は 2 以上の整数) とを備えた第二のプローブ群であるプローブ群 $B_1 \sim B_n$ ；

(b) 前記第 1 のプローブ群と、前記第 2 のプローブ群と、前記試料とを混合して、前記標的核酸群 $N_1 - N_n$ 中の前記第 1 の部分配列 $F_1 - F_n$ に前記プローブ分群 $A_1 - A_n$ をハイブリダイズさせるとともに、前記第 2 の部分配列 $S_1 - S_n$ に前記プローブ群 $B_1 - B_n$ をハイブリダイズさせる工程と、

(c) 前記標的核酸 $N_1 - N_n$ にハイブリダイズした前記プローブ群 $A_1 - A_n$ と前記プローブ群 $B_1 - B_n$ を夫々連結して、プローブ群 $(A_1 + B_1) - (A_n + B_n)$ (n は 2 以上の整数) を生じる工程と、

(d) 前記結合分子をそれと対をなす結合対のもう一方の物質に結合させることによりプローブ群 $(A_1 + B_1) - (A_n + B_n)$ を回収し、夫々のフラッグ $FL_1 - FL_n$ をエンコード反応する工程と、

(e) エンコード反応により得られたフラッグ $FL_1 - FL_n$ に相補的な配列 $FL_1' - FL_n'$ をデコード反応する工程と、

(f) デコード反応により得られた核酸分子を検出または定量することによって標的核酸 $N_1 - N_n$ を検出または定量する工程とを具備する方法。

12. 所定の配列を有する試料中の標的核酸群 $N_1 - N_n$ (n は 2 以上の整数) を検出または定量する方法であって、

(a) 以下のプローブ群 $A_1 - A_n$ (n は 2 以上の整数) とプローブ群 $B_1 - B_n$ (n は 2 以上の整数) を準備する工程と；

前記標的核酸群 $N_1 - N_n$ (n は 2 以上の整数) 中の第 1 の部分配列 $F_1 \sim F_n$ (n は 2 以上の整数) に相補的な配列 $F_1' - F_n'$ (n は 2 以上の整数) と、各 $F_1' - F_n'$ に連結された結合分子を備えた第一のプローブ群であるプローブ群 $A_1 - A_n$ 、

前記標的核酸群 $N_1 - N_n$ 中の第2の部分配列 $S_1 - S_n$ (n は2以上の整数) に相補的な配列 $S_1' - S_n'$ (n は2以上の整数) と、各 $S_1' - S_n'$ に連結された4ユニットからなるフラッグ $FL_1 - FL_n$ (n は2以上の整数) とを備えた第二のプローブ群であるプローブ群 $B_1 \sim B_n$;

(b) 前記プローブ群 $A_1 - A_n$ と、前記プローブ群 $B_1 - B_n$ と、前記試料とを混合して、前記標的核酸群 $N_1 - N_n$ 中の前記第1の部分配列 $F_1 - F_n$ に前記プローブ $A_1 - A_n$ をハイブリダイズさせるとともに、前記第2の部分配列 $S_1 - S_n$ に前記プローブ $B_1 - B_n$ をハイブリダイズさせる工程と、

(c) 前記標的核酸群 $N_1 - N_n$ にハイブリダイズした前記プローブ $A_1 - A_n$ と前記プローブ $B_1 - B_n$ をライゲートして、プローブ $(A_1 + B_1) - (A_n + B_n)$ (n は2以上の整数) を生じる工程と、

(d) 前記結合分子をこれと対をなす結合対のもう一方の物質に結合することによりプローブ群 $(A_1 + B_1) - (A_n + B_n)$ を回収し、夫々のフラッグ $FL_1 - FL_n$ をエンコード反応する工程と、

(e) エンコード反応により得られたフラッグ $FL_1 - FL_n$ に相補的な配列 $FL_1' - FL_n'$ (n は2以上の整数) をデコード反応する工程と、

(f) デコード反応により得られた核酸分子を検出することによって標的核酸群 $N_1 - N_n$ を検出または定量する工程と

を具備し、且つ前記4ユニットのうちの2ユニットが、PCR増幅におけるプライマーとして機能する配列であることを特徴とする方法。

13. 所定の配列を有する試料中の標的核酸を検出または定量する方法であって、

(a) 以下のプローブAとプローブBを準備する工程と；

前記標的核酸中の第1の部分配列Fに相補的な配列F'と、F'に連結された結合分子を備えた第1のプローブであるプローブA、および

前記標的核酸中の第2の部分配列Sに相補的な配列S'と、各S'に連結された4ユニットからなる配列から構成されたフラッグとを備えた第二のプローブであるプローブB〔ここで、前記フラッグは二本鎖配列であり、前記4ユニットは、夫々任意の配列を有するユニットであるSD、DO、D1およびEDからなり、これらの4つのユニットはSD + DO + D1 + EDのように連結している〕；

(b) 前記第1のプローブAと、前記第2のプローブBと、前記試料とを混合して、前記標的核酸中の前記第1の部分配列Fに前記プローブAをハイブリダイズさせるとともに、前記第2の部分配列Sに前記プローブBをハイブリダイズさせる工程と、

(c) 前記標的核酸にハイブリダイズした前記プローブAと前記プローブBをライゲートして、プローブ(A+B)を生じる工程と、

(d) 前記結合分子を、これと対をなす結合対のもう一方の物質に結合させることによってプローブ (A + B) を回収する工程と、

(e) 前記フラッグを構成する二本鎖核酸を変性することにより一本鎖にする工程と、

(f) 標識物質を付与した D 1 1 - D 1 n に相補的な配列をプライマーとして用いて、これを液相中に得られた一本鎖に対してハイブリダイズする工程と、

(g) 前記ハイブリダイズしたプライマーに対して伸長反応を行う工程と、

(h) 前記伸長したプライマーを含む二本鎖を変性することにより一本鎖にする工程と、

(i) 前記伸長したプライマーを D 0 1 - D 0 n と特異的にハイブリダイズさせることにより検出または定量することによって標的核酸を検出または定量する工程とを具備する方法。

14. 請求項 10 から 12 に記載の方法であって、前記デコード反応が以下の工程を具備することを特徴とする方法 [ここで、前記フラッグは二本鎖配列であり、前記 4 ユニットは、夫々任意の配列を有するユニットである S D、D O、D 1 および E D からなり、これらの 4 つのユニットは S D + D O + D 1 + E D のように連結している] ;

(i) エンコードされた一本鎖配列を結合分子を付与した S D 配列と、E D 配列をプライマーとして用いて P C R を行う工程と、

(ii) S D 配列に結合した結合分子を、これと対をなす結合対のもう一つの物質に結合することによって、前記 P C R 産物を回収する工程と、

(iii) 変性することによって前記 P C R 産物を一本鎖にする工程と、

(iv) 標識したプライマー $D 1 1' - D 1 n'$ を前記一本鎖にハイブリダイズする工程と、

(v) 前記プライマーを伸長する工程と、

(vi) 前記伸長したプライマーを変性することにより一本鎖とする工程と、

(vii) $D 0 1 - D 0 n$ の配列に対して、前記一本鎖とした伸長したプライマーを特異的にハイブリダイズさせることにより検出または定量することによって、標的核酸を検出または定量する工程とを具備する方法。

15. 請求項 10 から 12 に記載の方法であって、前記デコード反応が以下の工程を具備することを特徴とする方法
[ここで、前記フラッグは二本鎖配列であり、前記 4 ユニットは、夫々任意の配列を有するユニットである S D、D O、D 1 および E D からなり、これらの 4 つのユニットは S D + D O + D 1 + E D のように連結している] ;

(i) エンコードされた一本鎖配列を結合分子を付与した S D 配列と、E D 配列をプライマーとして用いて P C R を行う工程と、

(ii) S D 配列に結合した結合分子を、これと対をなす結合対のもう一つの物質に結合することによって、前記 P

C R 産物を回収する工程と、

(iii) 変性することによって前記 P C R 産物を一本鎖にする工程と、

(iv) 標識した配列 D 1 n ' と D 0 n ' とを混合し、前記一本鎖にハイブリダイズする工程と、

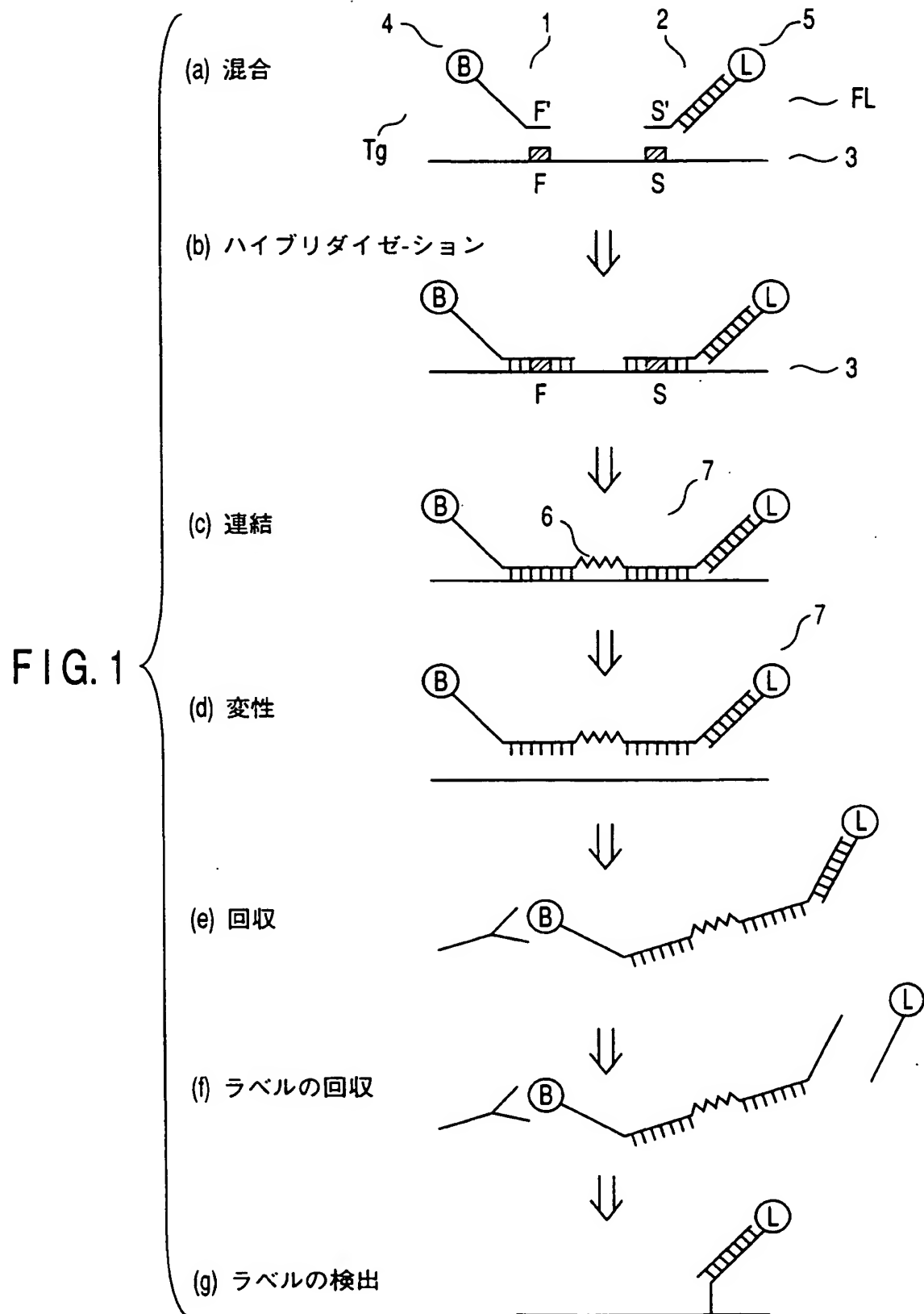
(v) 前記 D 1 n ' と D 0 n ' を連結する工程と、

(vi) 前記連結した配列を変性することにより一本鎖とする工程と、

(vii) D 0 1 - D 0 n の配列に対して、前記一本鎖とした標識した配列を特異的にハイブリダイズさせて、前記標識物質を検出または定量することによって、標的核酸を検出または定量する工程とを具備する方法。

16. 請求項 1 から 15 の何れか 1 項に記載の方法であって、前記第 1 の部分配列と第 2 の部分配列が隣接していることを特徴とする方法。

1/14



2/14

FIG. 2

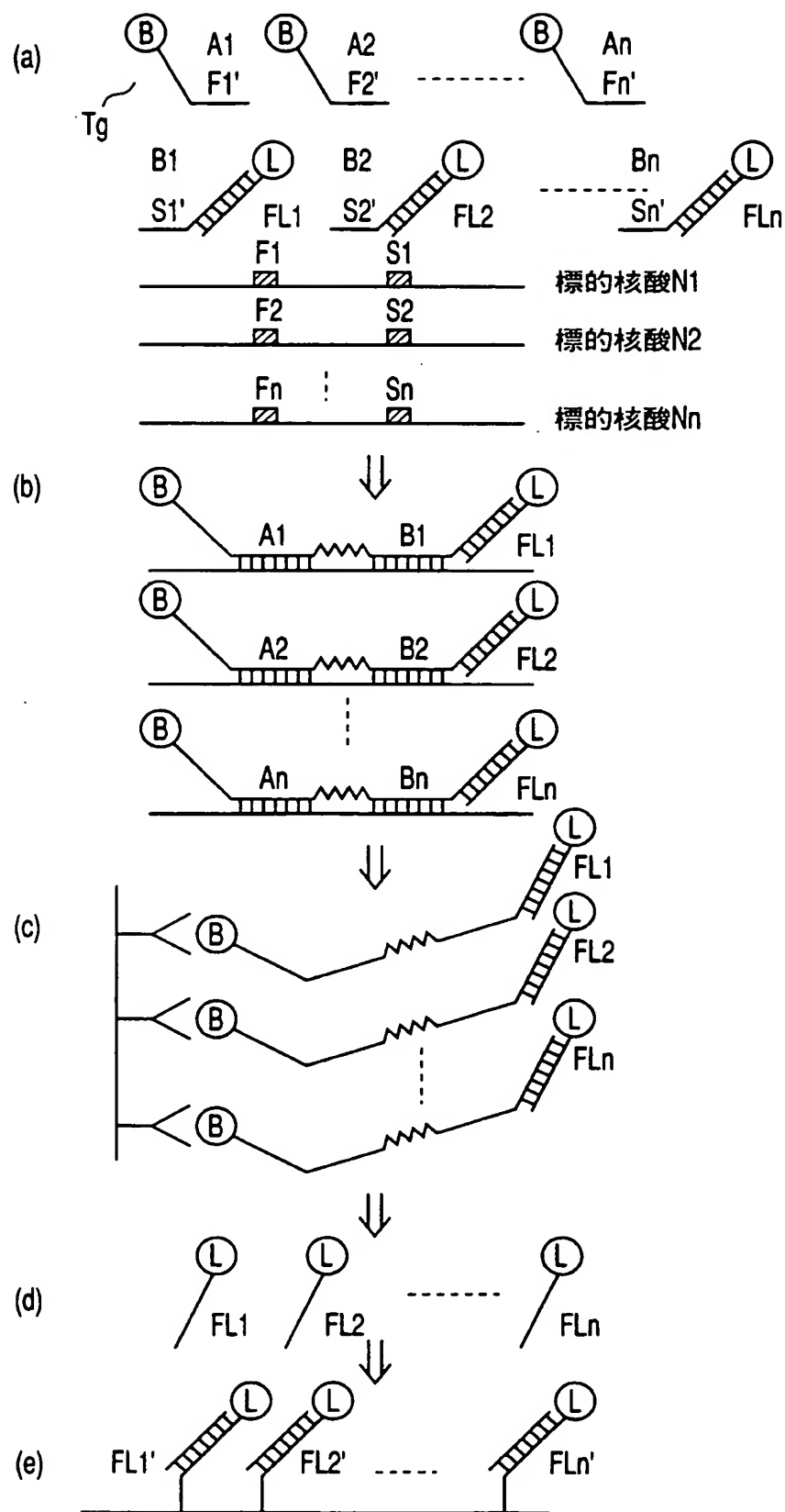
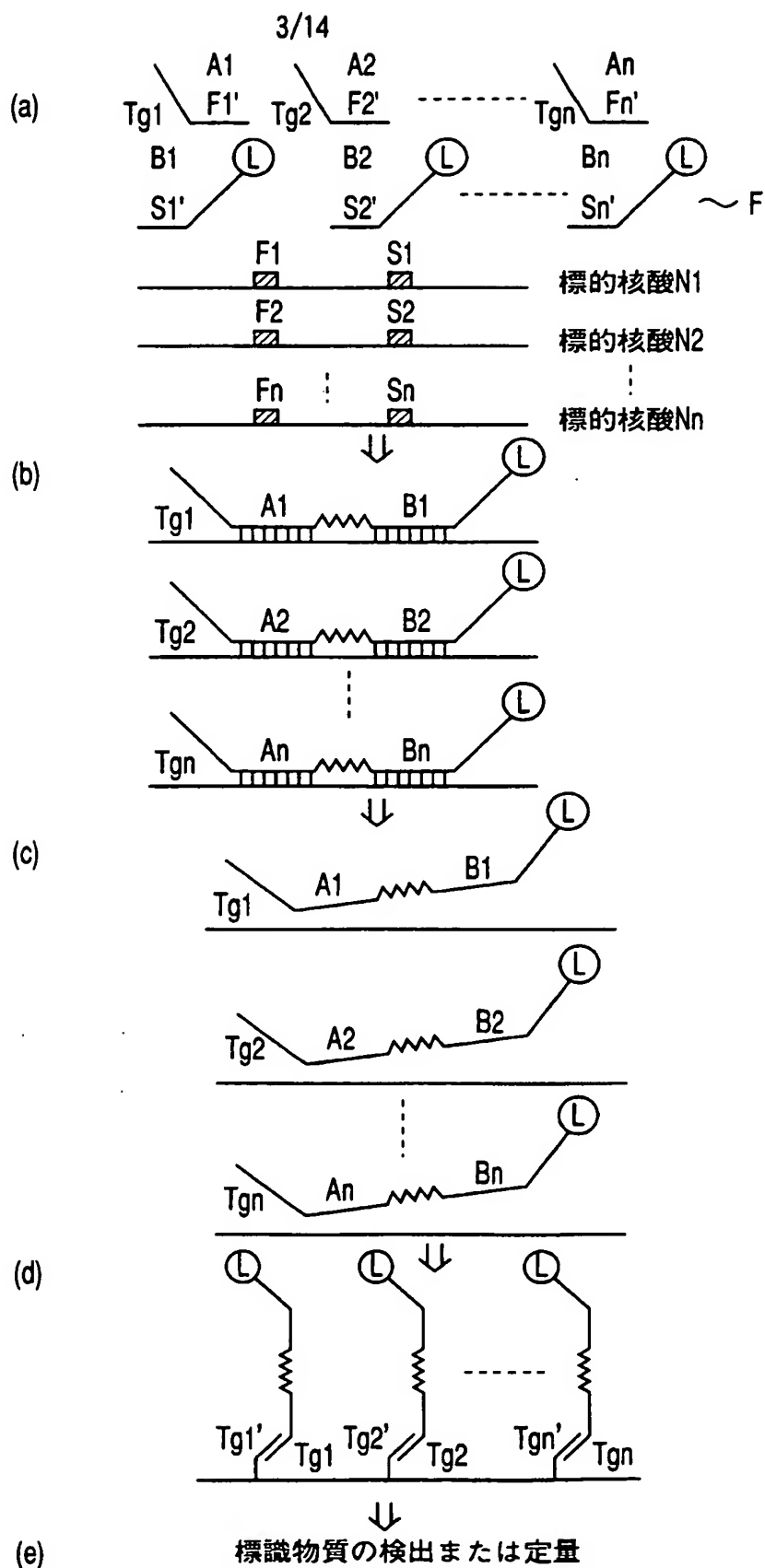
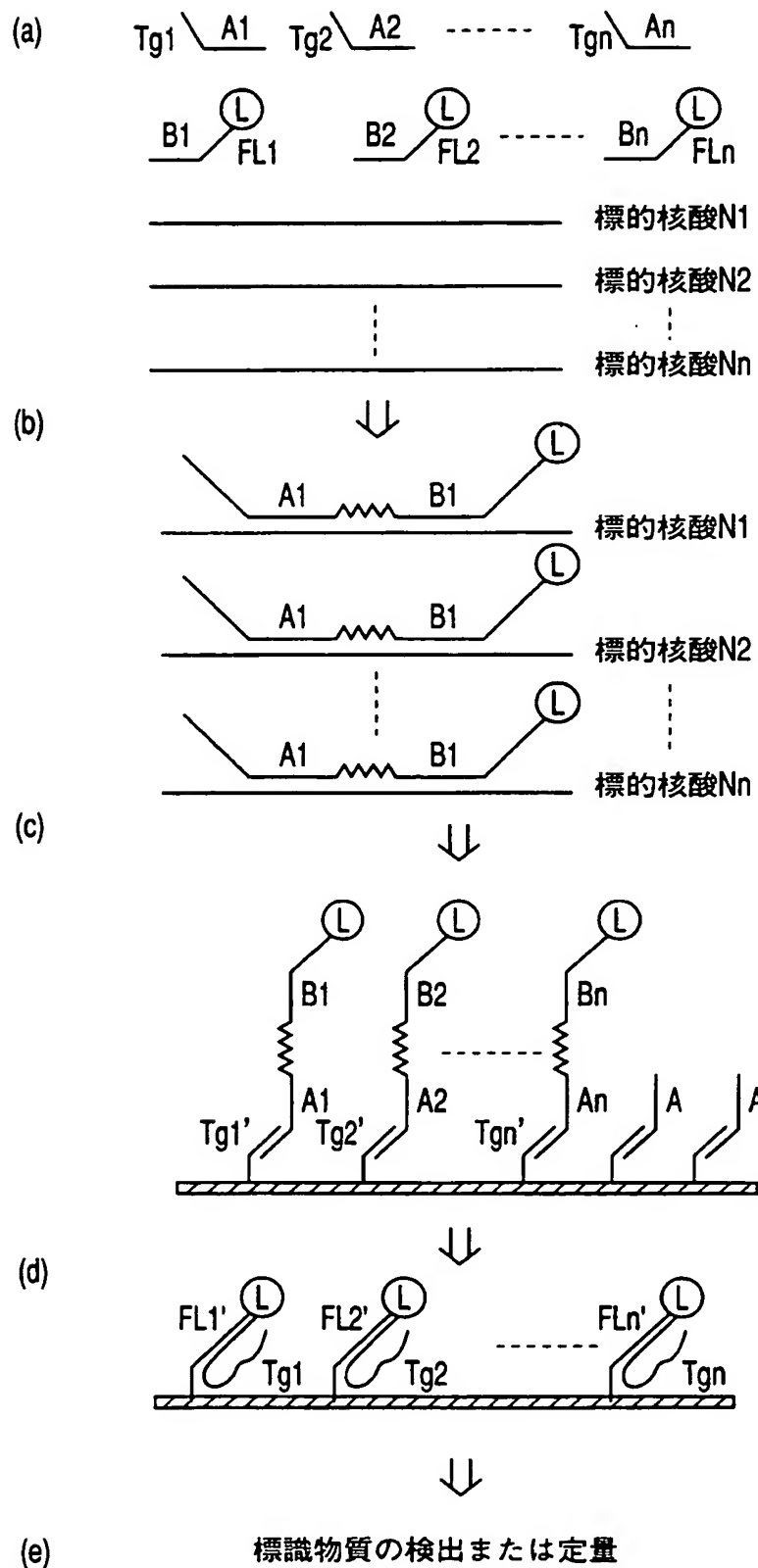


FIG. 3

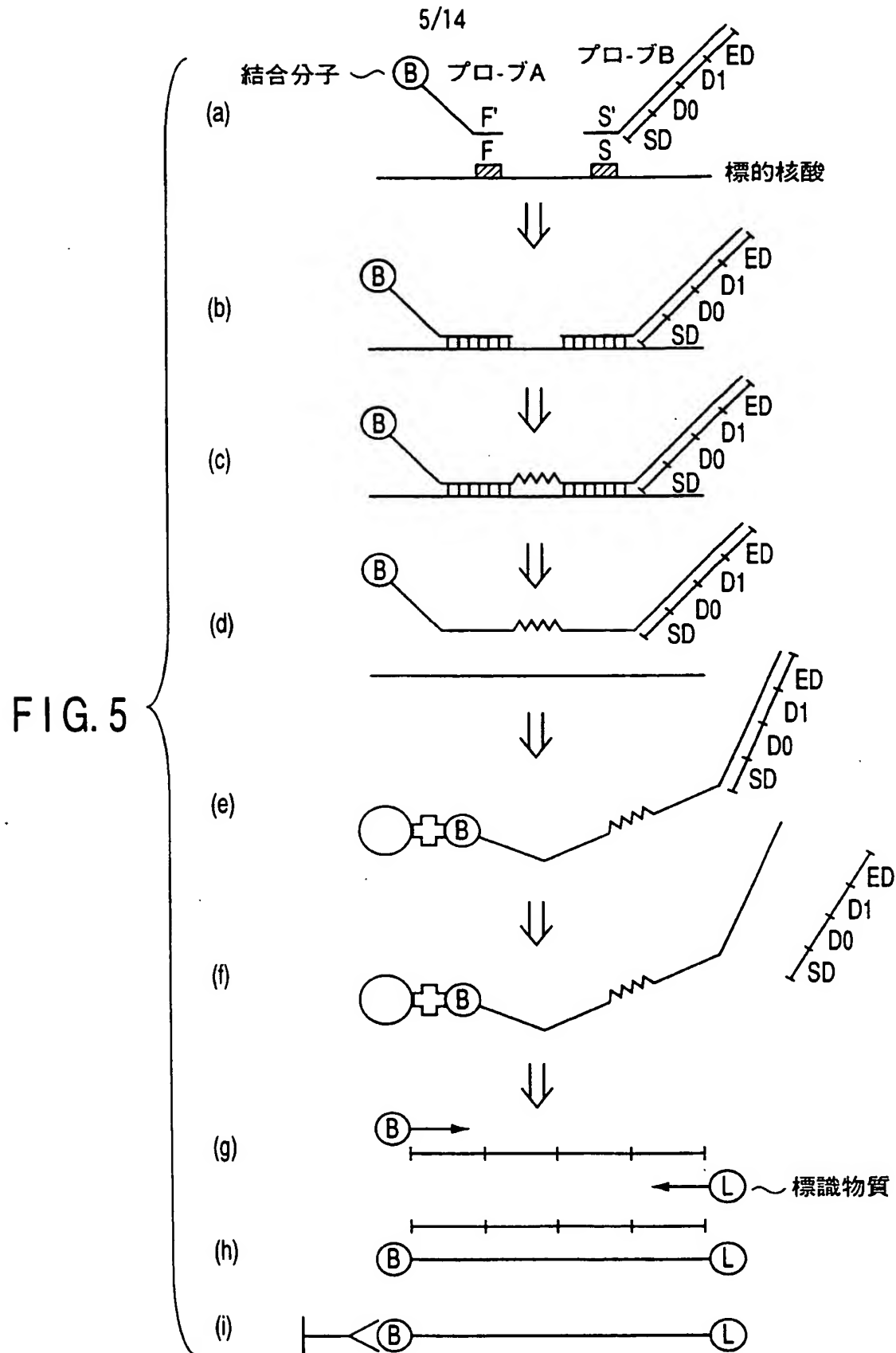


4/14

FIG. 4



5/14



6/14

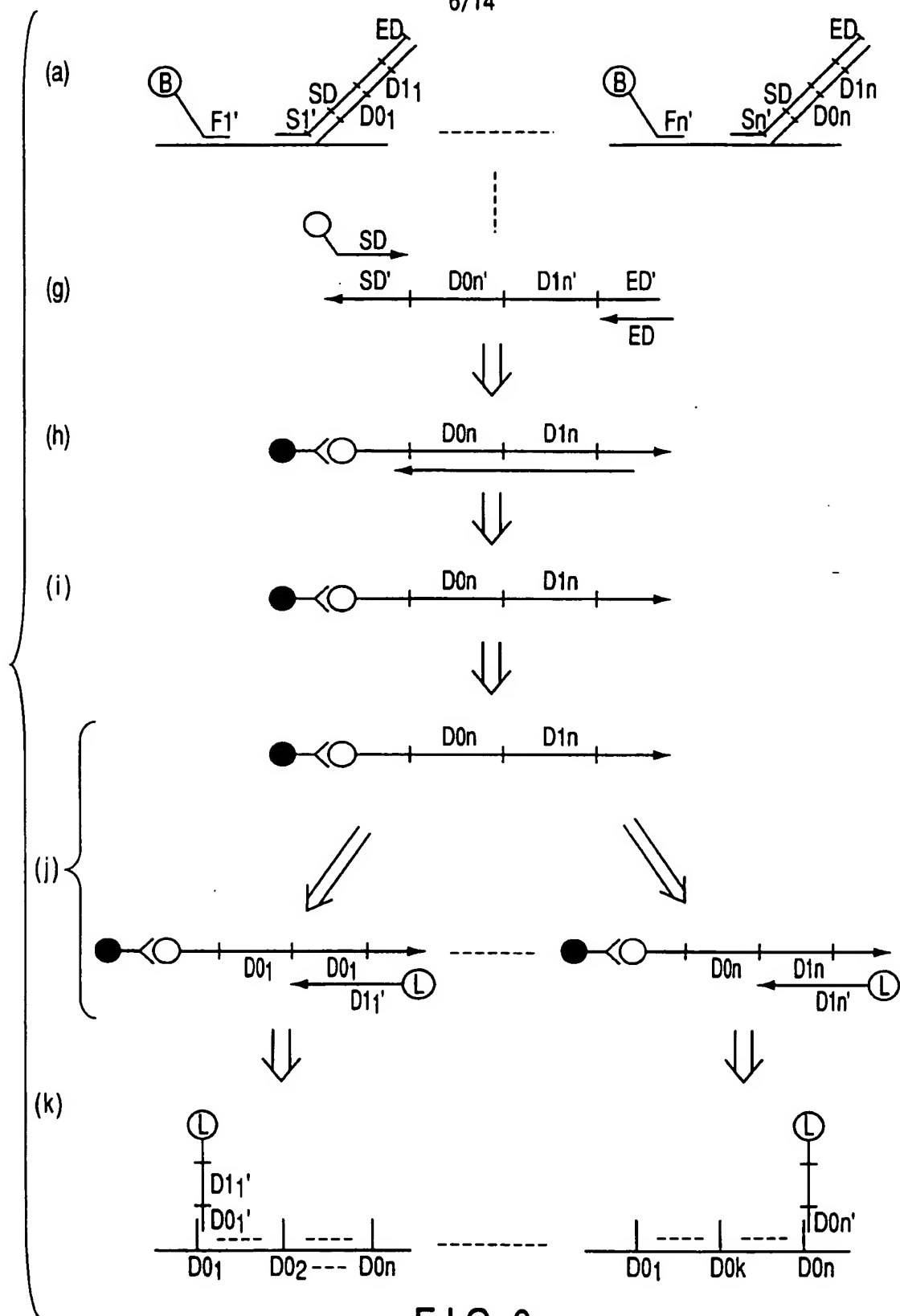


FIG. 6

7/14

		D0									
		D0-1	D0-2	D0-3	D0-4	D0-5	D0-6	D0-7	D0-8	D0-9	D0-10
D1	D1-1	1									
	D1-2										
	D1-3										
	D1-4										
	D1-5										
	D1-6										
	D1-7										
	D1-8										
	D1-9										
	D1-10										

FIG. 7A

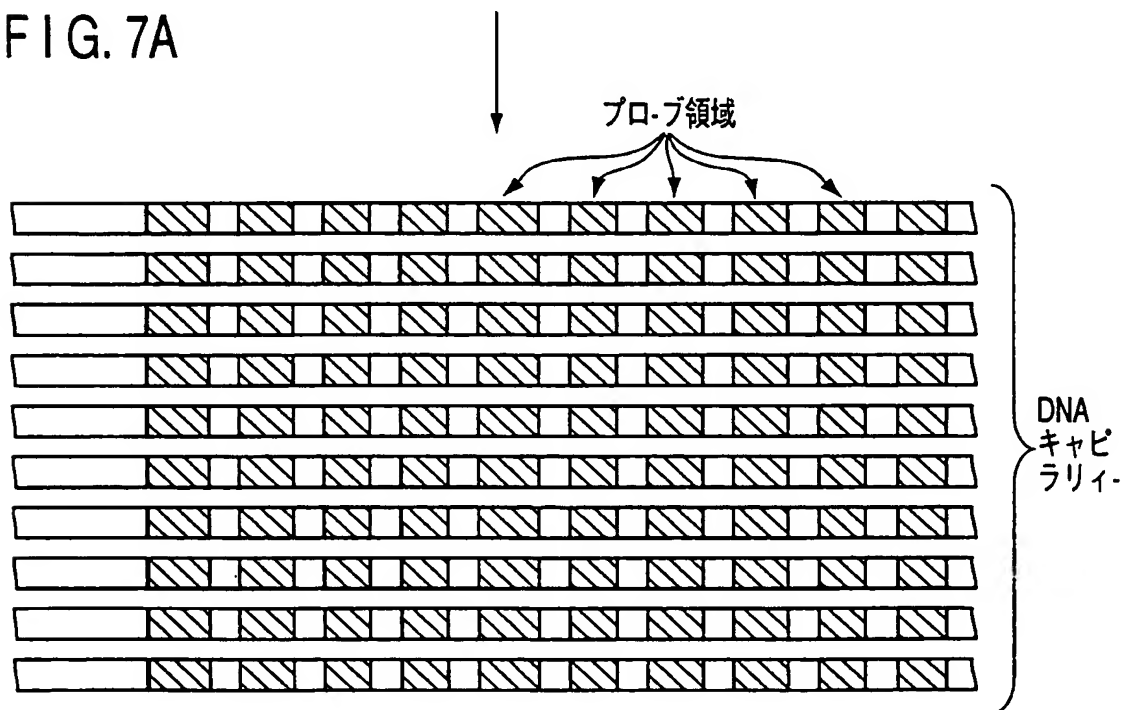


FIG. 7B

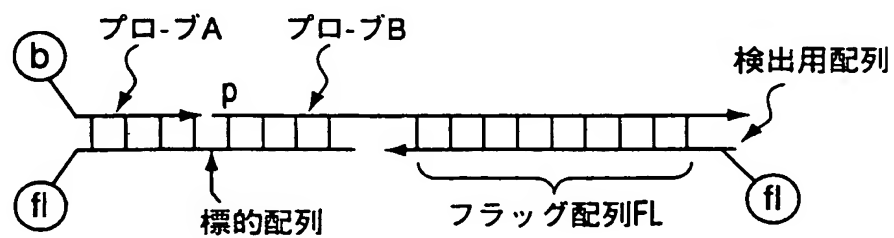


FIG. 8

FIG. 9

	名称	配列 (5'→3')
プロ-7A	b-16A	b-CTAgTAgggTgAAgTC
プロ-7B	P-16B-48	P-CATAAgAgCCCCCTAgAgCATgCTggTCAAaggggCACgCggTTCATCaggAgTCgAAggCaggACg
標的配列	r-32-fl	CTCTAgggCTCTTAIggaCTTCACCCCTACTAg-fl
検出用配列	fl-r-48	fl-CgTCCtgCCtTCgACTCCtTgATgAACCGgTgCCCCtTgACCAgCATg
変異配列	fl-neg-r-32AB	fl-TTCTAgAgCTCCTATggACTTCGCCCTACTAg

9/14

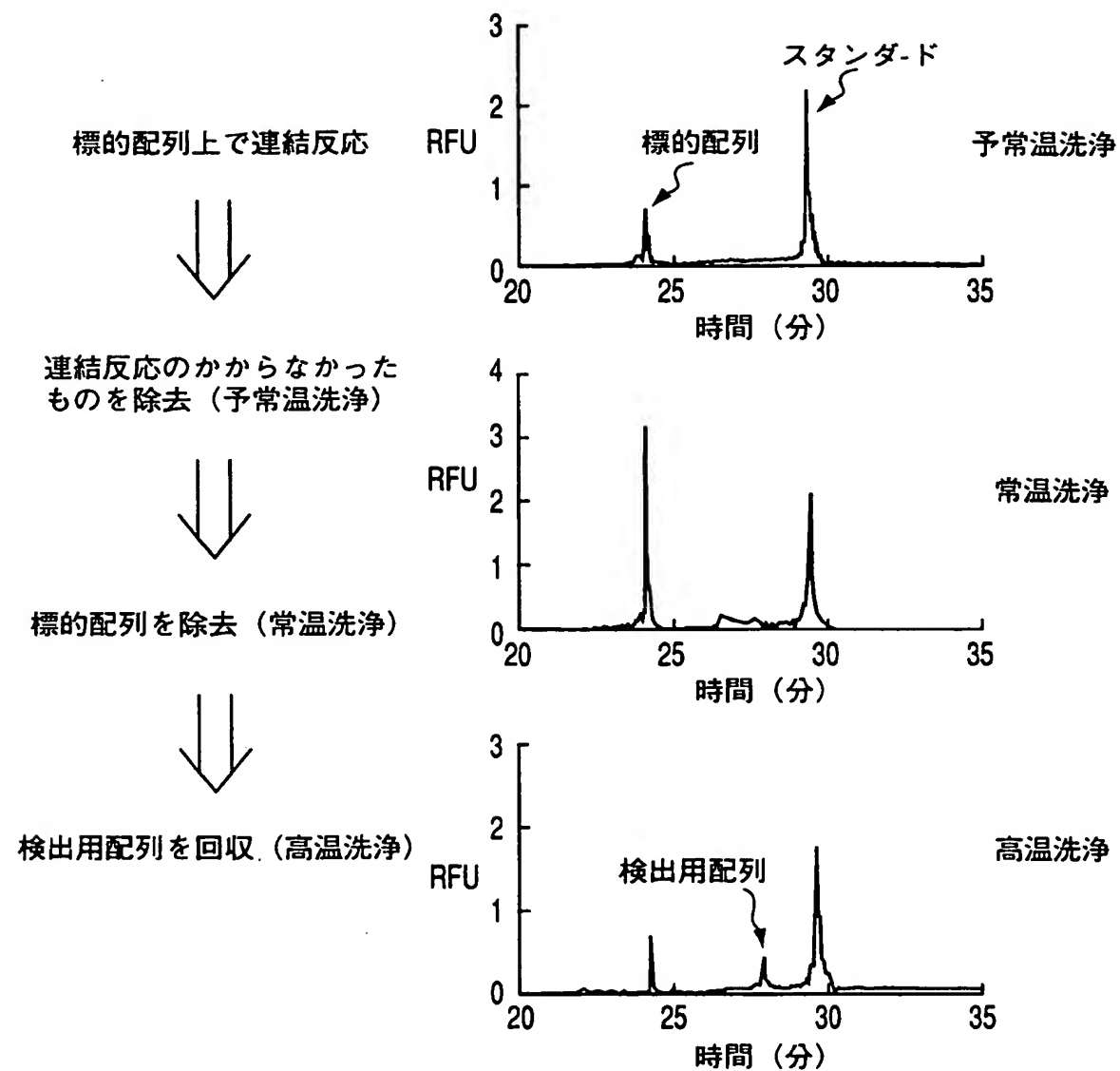


FIG. 10

10/14

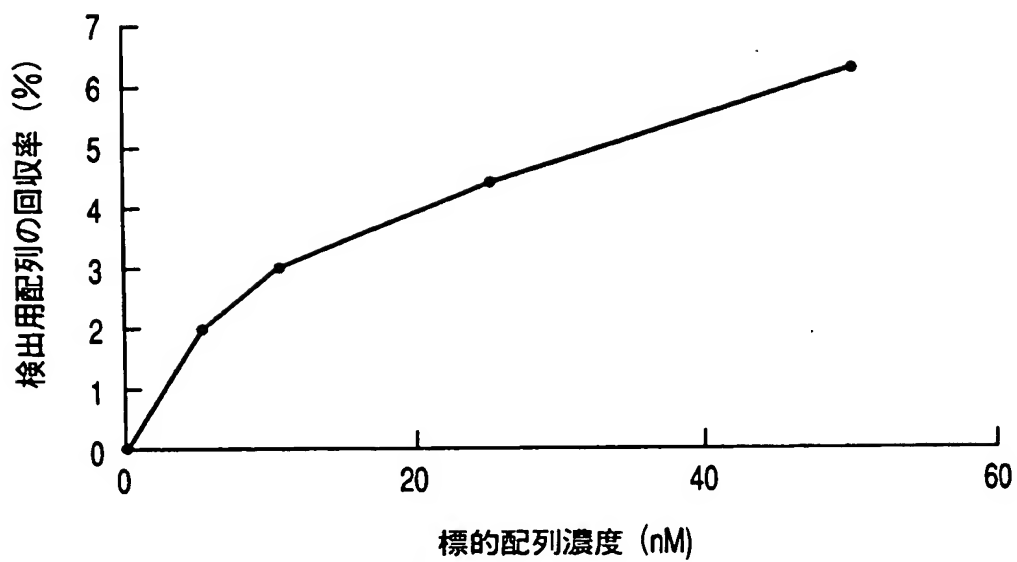


FIG. 11

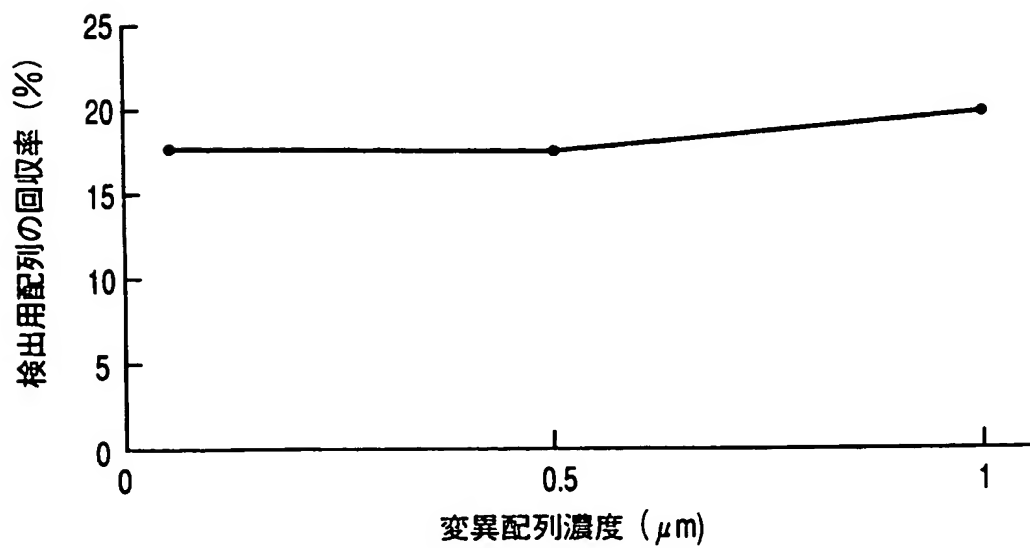
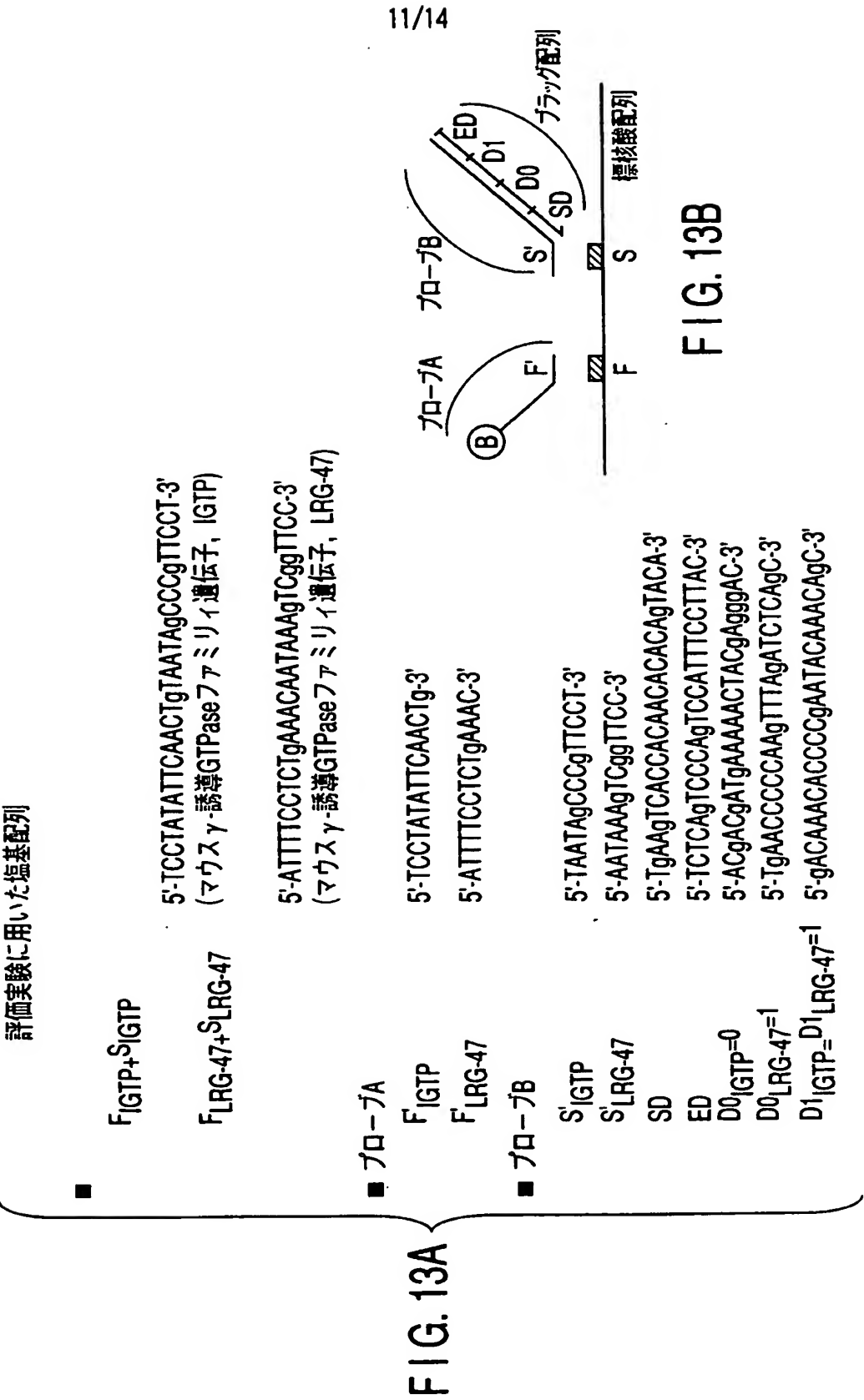
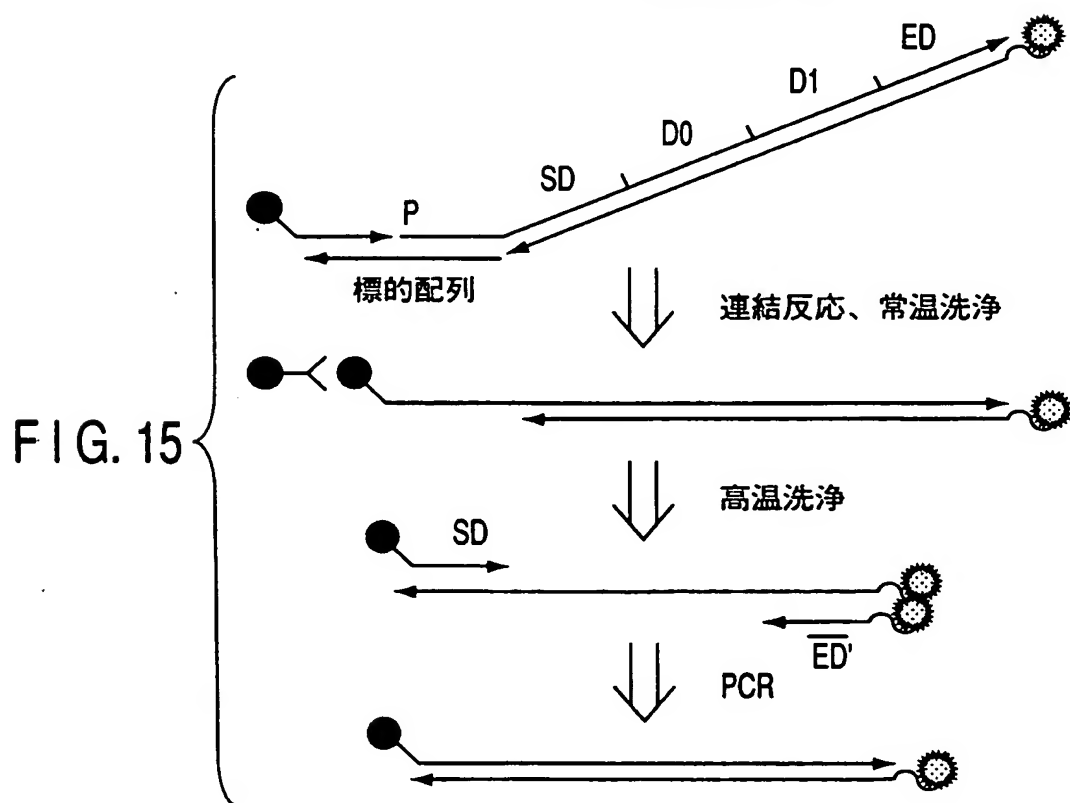
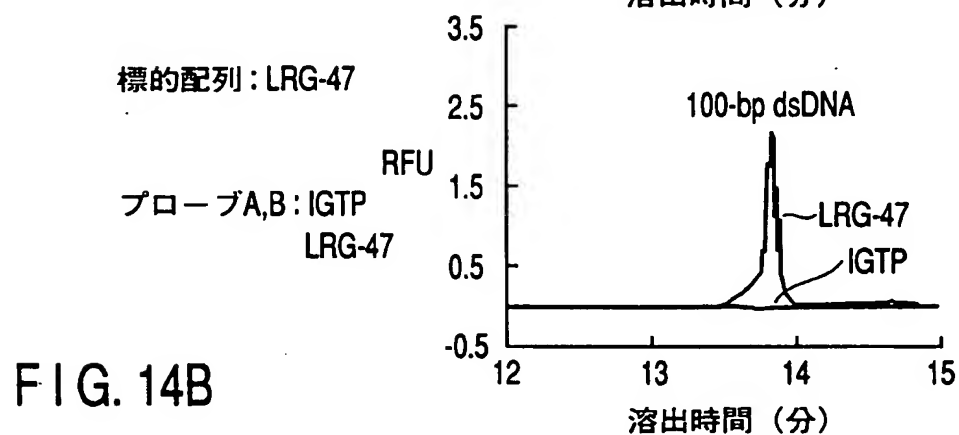
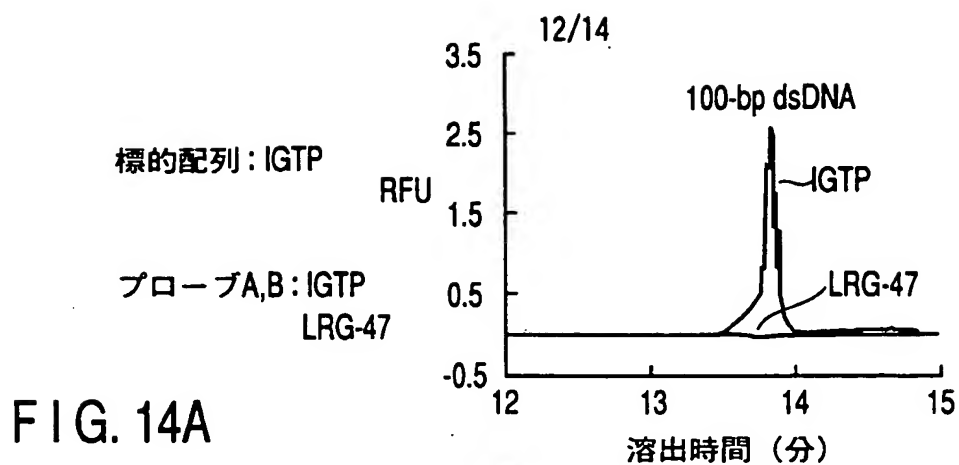


FIG. 12





13/14

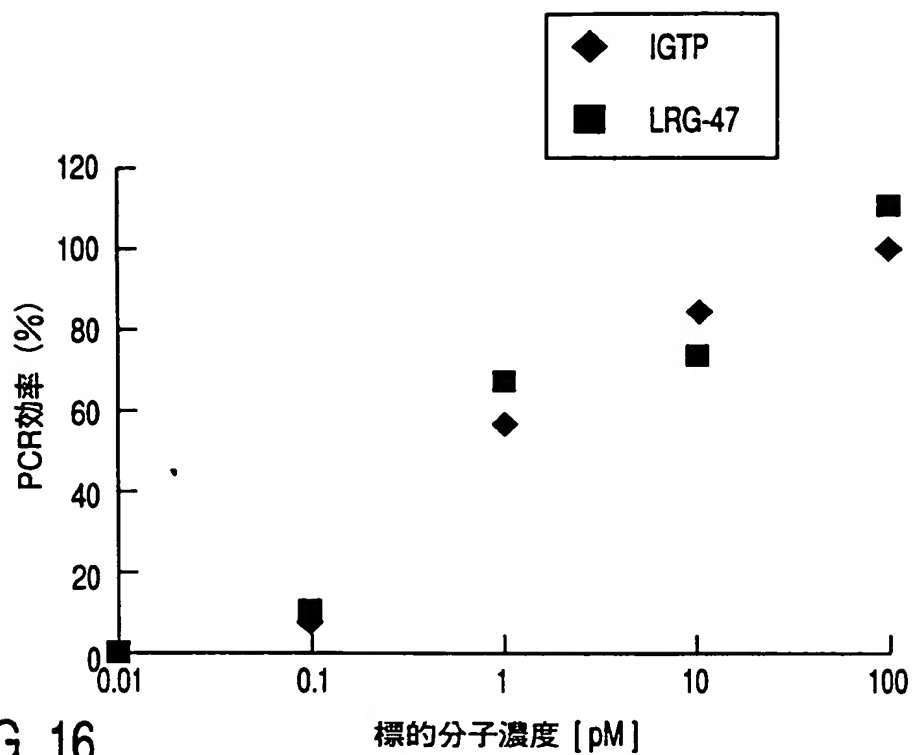
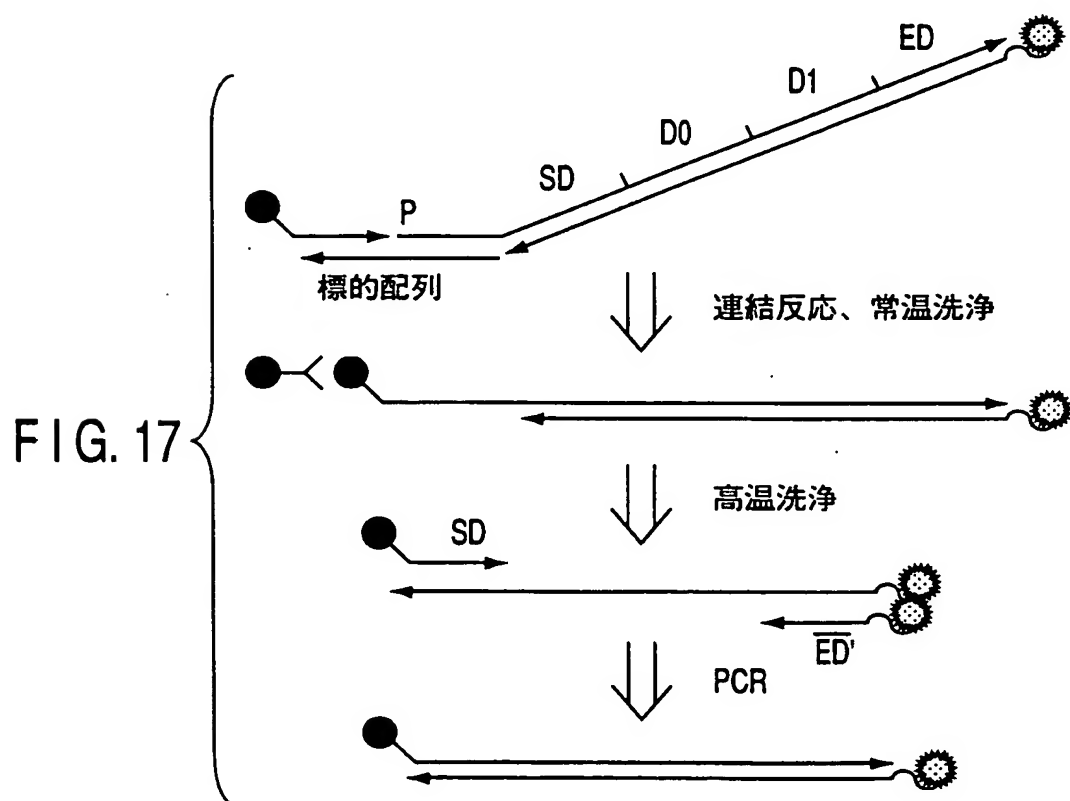


FIG. 16



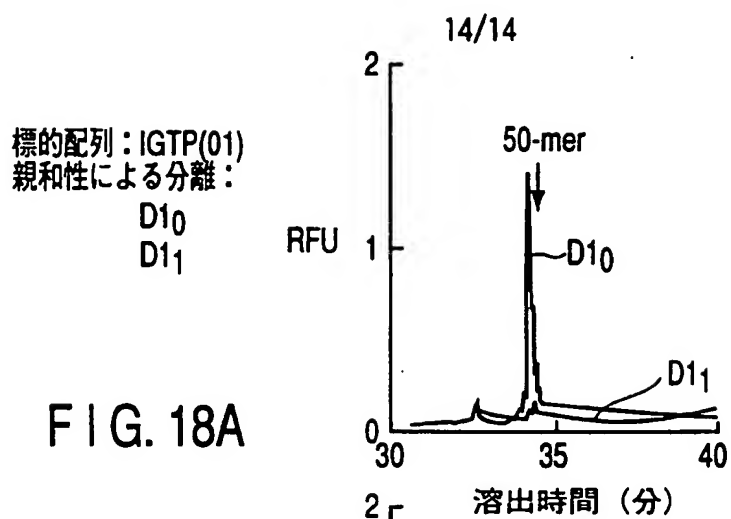


FIG. 18A

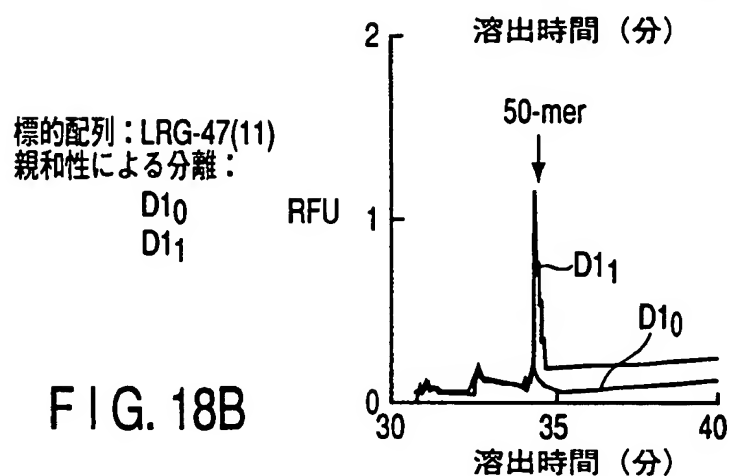


FIG. 18B

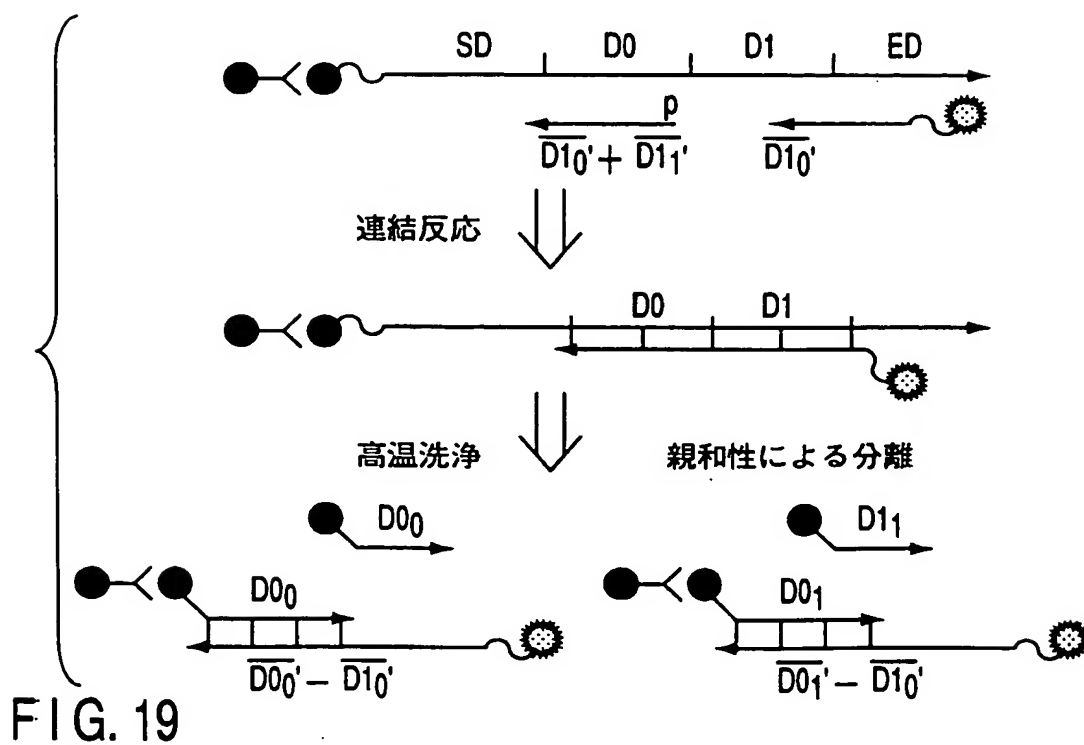


FIG. 19

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP00/06919

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER Int.Cl ⁷ C12Q1/68		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) Int.Cl ⁷ C12Q1/68		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) JOIS, BIOSIS (DIALOG), WPI (DIALOG)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	EP, 246864, B (BIO-RAD LAB INC, BIO RAD LABS INC, IMPERIAL CHEM IND PLC), 13 July, 1994 (13.07.94) & JP, 2683336, B & JP, 2622255, B & DE, 3750198, G	1-16
A	EP, 466367, B (WAKUNAGA SEIYAKU KK), 23 August, 1995 (23.08.95) & JP, 2792757, B & JP, 2972685, B & US, 5741638, A & DE, 69112309, E	1-16
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 20 December, 2000 (20.12.00)		Date of mailing of the international search report 26 December, 2000 (26.12.00)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office Facsimile No.		Authorized officer Telephone No.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl⁷ C12Q1/68

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl⁷ C12Q1/68

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

JOIS, BIOSIS (DIALOG), WPI (DIALOG)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	EP, 2 4 6 8 6 4, B (BIO-RAD LAB INC, BIO RAD LABS INC, IMPERIAL CHEM IND PLC) 13. 7月. 1994 (13. 07. 94) & JP, 2 6 8 3 3 3 6, B & JP, 2 6 2 2 2 5 5, B & DE, 3 7 5 0 1 9 8, G	1-16
A	EP, 4 6 6 3 6 7, B (WAKUNAGA SEIYAKU KK) 23. 8月. 1995 (23. 08. 95) & JP, 2 7 9 2 7 5 7, B & JP, 2 9 7 2 6 8 5, B & US, 5 7 4 1 6 3 8, A & DE, 6 9 1 1 2 3 0 9, E	1-16

☐ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

- 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

- 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

20. 12. 00

国際調査報告の発送日

26.12.00

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

上條 肇

4N

9839

電話番号 03-3581-1101 内線 3488